

Departement für Pferde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Vorsteher: Prof. Dr. med. vet. Colin C. Schwarzwald

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg

**Entzündungshemmende Wirkung von makrozyklischem
Carbonsuboxid (MCS-18) aus Helleborus purpurascens
auf equine Knorpelzellen
(in vitro-Studie)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Dorina Truniger-Hambsch

Tierärztin
von Kirchberg/SG und Turgi/AG

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin
Prof. Dr. biol. hum. Karin Würtz-Kozak, Korreferentin

2019

Inhaltsverzeichnis

1.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
2.	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	6
2.1	ZUSAMMENFASSUNG (DEUTSCH)	6
2.2	SUMMARY (ENGLISH).....	7
3.	EINLEITUNG	8
4.	LITERATUR.....	9
4.1	HELLEBORUS PURPURASCENS	9
4.1.1	<i>MCS-18 aus Helleborus purpurascens</i>	10
4.1.2	<i>Pharmakologisch-toxikologische Studien</i>	11
4.2	OSTEOARTHRITIS	12
4.3	KNORPEL	12
4.3.1	<i>Extrazellulärmatrix</i>	13
4.3.2	<i>Matrix Metalloproteinasen</i>	14
4.4	ZYTOKINE.....	16
4.4.1	<i>Interleukin 1 (IL-1)</i>	17
4.4.2	<i>Interleukin 6 (IL-6)</i>	18
4.5	LOKALE MEDIATOREN	19
4.5.1	<i>Stickoxid (NO) und iNOS</i>	19
4.5.2	<i>Prostaglandine (PGE₂) und Cox-2</i>	19
4.6	LIPOPOLYSACCHARID (LPS)	20
5.	MATERIAL UND METHODEN	21
5.1	BIOCHEMISCHE ANALYSE	22
5.1.1	<i>NO</i>	22
5.1.2	<i>PGE₂</i>	22
5.1.3	<i>Caseinolytische Aktivität (Stromelysin/MMP 3)</i>	23
5.1.4	<i>Kollagenolytische Aktivität</i>	23
5.1.5	<i>Kollagen</i>	24
5.1.6	<i>PCR</i>	26
5.1.7	<i>Statistik</i>	28
5.2	VORVERSUCH (EVALUATION DER GEEIGNETEN MCS-KONZENTRATION).....	29
5.2.1	<i>Vorversuch A</i>	29
5.2.2	<i>Vorversuch B</i>	29
5.2.3	<i>Vorversuch C</i>	29
5.2.4	<i>Vorversuch D</i>	30
5.3	HAUPTVERSUCH	31
5.3.1	<i>Repetition 1</i>	31

5.3.2	<i>Repetition 2</i>	32
6.	RESULTATE	33
6.1	VORVERSUCH	33
6.1.1	<i>Vorversuch A</i>	33
6.1.2	<i>Vorversuch B</i>	33
6.1.3	<i>Vorversuch C</i>	34
6.1.4	<i>Vorversuch D</i>	35
6.2	HAUPTVERSUCH	36
6.2.1	<i>NO ($\mu\text{mol/l}$)</i>	36
6.2.2	<i>PGE₂ (pg/ml)</i>	36
6.2.3	<i>Kollagen und Kollagenolytische Aktivität</i>	39
6.2.4	<i>Proteoglykane (PG) (mg/g Knorpel)</i>	40
6.2.5	<i>MMP-3 (Stromelysin) (Units/ml)</i>	40
6.2.6	<i>PCR aus Knorpel</i>	41
6.2.7	<i>Übersicht über alle gemessenen Parameter im Hauptversuch</i>	43
6.3	REPETITIONEN	44
6.3.1	<i>Repetition 1</i>	44
6.3.2	<i>Repetition 2</i>	50
7.	DISKUSSION	52
7.1	ALLGEMEINES	52
7.2	METHODEN	52
7.3	VORVERSUCH	52
7.4	HAUPTVERSUCH	53
7.4.1	<i>LOKALE ENTZÜNDUNGSMEDIATOREN (NO UND PGE₂)</i>	54
7.4.2	<i>ZYTOKINE (IL-1 UND IL-6)</i>	55
7.4.3	<i>METALLOPROTEINASE (MMPs)</i>	56
7.4.4	<i>MATRIXPROTEINE (PROTEOGLYKAN, KOLLAGEN)</i>	56
7.4.5	<i>GADPH</i>	57
7.5	<i>Repetitionen</i>	57
7.6	<i>Schlussfolgerung</i>	57
7.7	<i>Ausblick</i>	58
8.	LITERATURVERZEICHNIS	59
9.	DANKSAGUNG	
10.	CURRICULUM VITAE	

1. Abkürzungsverzeichnis

C (50, 100)	Concentration
Cox-2	Cyclooxygenase-2
C _T	Der C _T -Wert einer PCR entspricht der Zahl der Zyklen, die benötigt werden, bis ein definierter Fluoreszenzwert erreicht wird. Maximal mögliche Zyklen: 45.
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMBA	4-Dimethylamino-Benzaldehyd
EZM	Extrazellulärmatrix
GAPDH	Glutaraldehydphosphatdehydrogenase
IL	Interleukin
IL-1-Ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
i.m.	Intramuskulär
iNOS	induzierbare Nitroxid-Synthase
i.v.	Intravenös
LPS	Lipopolysaccharid
MCS	Macrocyclic Carbon Suboxid
MMP	Matrix Metalloproteinase
NaOH	Natrium hydroxide
NO	Nitric Oxid (Stickoxid)
OA	Osteoarthritis (progressive degenerative Gelenkserkrankung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Proteoglykane
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
RA	Rheumatoide Arthritis (chronische Polyarthritis)
SNP	Sodium Nitroprusside (Natrium Nitroprussid)
TIMP	Tissue Inhibitor (Gewebsinhibitor)
TNF	Tumor Nekrose Faktor

2. Zusammenfassung/Summary

2.1 Zusammenfassung (Deutsch)

Helleborus purpurascens wird als Heilpflanze seit Jahrhunderten beschrieben. Ziel dieser in-vitro Studie war, eine entzündungshemmende Wirkung von MCS-18 aus Helleborus purpurascens auf equine Knorpelzellen nachzuweisen.

Sechs geschlachteten Pferden wurde Knorpel aus dem Fesselgelenk entnommen, zerkleinert und mit Nährmedium (mit Streptomycin + Penicillin) versetzt. Eine Entzündung wurde mit Lipopolysaccharid (LPS) simuliert. MCS-18 wurde in Konzentrationen von 0.1% und 0.05% verwendet. 48 Proben im Doppel wurden in 4 Gruppen unterteilt: Kontrolle, LPS, MCS und MCS-LPS. Nach 24-stündiger Inkubation unter Standardbedingungen (5% CO₂, 37°C) wurden Knorpel und Medium bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

Zur Auswertung wurden NO, PGE₂, Kollagen, kollagenolytische Aktivität, Proteoglykane, Stromelysin, Cox2, iNOS, IL-1, IL-6, MMP-1 und MMP-3 bestimmt.

In der MCS-Gruppe konnte eine Erhöhung aller Parameter gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese war überall niedriger als bei der LPS-Gruppe, ausser IL-1 und Kollagen, welche bei allen Gruppen gleich hoch waren. Die MCS-LPS-Gruppe zeigte überall die höchsten Messwerte. Es konnte keine Herunterregulierung von der MCS-LPS-Gruppe gegenüber der LPS-Gruppe beobachtet werden.

Diese Studie kann die entzündungshemmende Wirkung von MCS-18 in-vitro nicht erklären. Weitere Studien zeigen eine immunsuppressive Wirkung von MCS-18, was dessen entzündungshemmende Wirkung bei muskuloskeletalen Schmerzen erklären würde.

2.2 Summary (English)

Helleborus purpurascens as medicinal plant has been described for a long time. The goal of this in-vitro study was to verify an anti-inflammatory effect of MCS-18 out of *Helleborus purpurascens* on equine cartilage cells.

Cartilage from the fetlock of six slaughtered horses was crushed and placed into 6-well plates containing nutrient mixture (with Streptomycin and Penicillin). An inflammatory reaction was simulated by Lipopolysaccharid (LPS). In the main test MCS-18-concentration of 0.1% and 0.05% was used. 48 samples (in duplicate) were subdivided in 4 groups: control, LPS, MCS and MCS-LPS. After incubation of 24 hours in a cell culture incubator under standard conditions (5% CO₂, 37°C) the cartilage and medium were stored separately in the freezer at -20°C until assayed.

For analysis NO, PGE₂, collagen, collagenolytic activity, proteoglycane, stromelysin activity as well as Cox2, iNOS, IL-1, IL-6, MMP-1 and MMP-3 were measured.

In the MCS-group was found an increase of all parameters versus the control-group. Those were lower than the results out of the LPS-group, except IL-1 and collagen, which was in all groups about equal. The MCS-LPS showed all over the highest result. There was no evidence of a down-regulation of the MCS-LPS-group versus the LPS-group.

The anti-inflammatory effect of MCS-18 cannot be explained by this in-vitro study. Other studies verify an immunosuppressive effect of MCS-18. This could explain an anti-inflammatory effect on musculoskeletal pain.

3. Einleitung

In der Volksmedizin auf dem Balkan wird die Wurzel von *Helleborus purpurascens* schon seit Jahrhunderten bei rheumatischen Beschwerden eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine transdermale Applikation bei Nutztieren eine Leukozytose, sowie eine Neutrophilie ausgelöst werden kann, um somit bei chronischen Erkrankungen eine schnellere Heilung zu erzielen⁸. Der genaue Wirkmechanismus war jedoch bisher unbekannt.

Mitte der neunziger Jahre konnte Dr. F. Kerek aus der Wurzel von *Helleborus purpurascens* ein makrozyklisches Carbonsuboxid (MCS-18) isolieren, welches als ein sehr potenter Inhibitor der Na⁺/K⁺-ATPase gilt⁵².

Ziel dieser Studie war, anhand einer in-vitro Studie mit equinen Chondrozyten mittels Messung der bei Osteoarthritis vorkommenden proinflammatorischen Moleküle NO und PGE₂, die Knorpelmatrixbestandteile Kollagen und Proteoglykan, sowie weitere in der Entzündungskaskade involvierten Mediatoren wie IL-1, IL-6, Cox2, MMP-1, MMP-3, eine mögliche weitere Erklärung der Wirkung von MCS-18 zu erhalten.

4. Literatur

4.1 Helleborus purpurascens

Helleborus purpurascens (Purpurnieswurz, Balkan Lenzrose, Balkannieswurz) gehört der Familie der Hahnenfussgewächse (Ranunculaceae) an, die ursprünglich vor allem auf dem Balkan zu finden ist, wo sie schon seit Jahrhunderten als Heilpflanze bei Nutztieren eingesetzt wird. In Westeuropa wird die Pflanze auch als Gartenzierpflanze kultiviert. Es handelt sich dabei um ein bis 30cm hoch werdendes, mehrjähriges Kraut mit handförmig geteilten, lanzettförmigen, gezähnten Blättern. Die nickenden, purpurfarbenen Blüten erscheinen zwischen Januar und März.

Eine Studie beschreibt den Einsatz als Heilpflanze durch transdermale Implantation des Wurzelextraktes. Dazu wurden die Haut der Pferde und Rinder mit einer dicken Nadel perforiert, das Transplant eingebracht und dort 24 Stunden belassen. Diese Methode ist mehr als 100 Jahre alt und daher nirgends in der Literatur zu finden. Der genaue Wirkmechanismus ist unbekannt, es konnte jedoch 1990 in einer Studie (bei Pferden, Rinder, Schafen und Schweinen) nachgewiesen werden, dass durch das Implantat eine Leukozytose und Neutrophilie, sowie eine erhöhte Phagozytose ausgelöst werden kann, die bei chronischen Erkrankungen den Heilungsprozess beschleunigen. Bei Pferden und Rindern (die Implantate wurden in die Haut am Thorax eingebracht) konnte eine Abszedierung, sowie Leistungsschwäche und Fieber beobachtet werden, worauf die Methode als nicht ideal für diese Tierarten erachtet wurde. Schweine und Schafe hingegen (die Implantate wurden ins Ohr eingebracht) tolerierten die Methode problemlos⁸.

2017 beschreibt Malik et. al. eine antiinflammatorische Wirkung von *Helleborus purpurascens* Wurzel-Extrakt, wobei *H. purpurascens* mit anderen Pflanzen der Familie der Ranunculaceae verglichen wurde. Dabei zeigte *H. purpurascens* die stärkste Hemmung von COX-1, COX-2 und 5-LOX. Als verantwortliche Substanz für die Wirkung vermuten Malik et. al. unter anderem Fettsäurekomplexe, v.a. α -Linolensäuren⁶⁶.

Abb. 1: *Helleborus purpurascens*

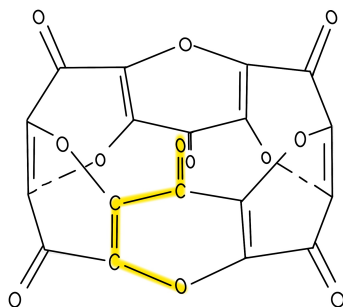


4.1.1 MCS-18 aus *Helleborus purpurascens*

Als pharmakologisch wirksame Substanzen sind bereits Hellebrin (ein Herzglykosid)¹⁹, eine bufadienolische Verbindung⁷⁸ und andere Naturstoffe daraus isoliert worden. Weiter wurde aus getrockneten Wurzeln von *Helleborus purpurascens* ein Makrozyklisches Carbon Suboxid (MCS-18) isoliert. Die Gewinnung von MCS-18 erfolgt durch Entfettung der Wurzeln mit Hexan. Diese wurde mit wässrigem Ethanol bei Raumtemperatur extrahiert. Eine gereinigte Vorstufe des Extrakts erhielt man durch mehrere flüssig/flüssig Extraktionen. Weiter konnte der Extrakt gereinigt werden durch Lösung in Aceton und Fällung mit Hexan. Dieser Niederschlag wurde nach dem Zentrifugieren im Vakuum getrocknet und stellte den in dieser Studie verwendete Extrakt dar⁵³.

Die 1996 von F. Kerek erstmals beschriebenen makrozyklischen Carbon Suboxid-Oligomere stellen eine neue Substanzgruppe dar. Die in Abbildung 2 dargestellte hypothetische Struktur zeigt ein Molekül, welches sowohl als organische wie auch als anorganische Substanz eingestuft werden könnte. Die Struktur von MCS-18 leitet sich vom einfachen anorganischen Gas Carbon Suboxid (C_3O_2)_n ab. Hexamere und Oktamere dieses Gases formen makrozyklische Ringe, die Makrozyklische Carbon Suboxid (MCS-18) Derivate genannt werden. Sie gelten als starke Na-K-ATPase Inhibitoren^{52,34}.

Abb. 2: Chemische Struktur von hexamerischem MCS (Carbon Suboxid in Gelb)^{102,103}



In verschiedenen Studien wird gezeigt, dass MCS-18 eine potentiell entzündungshemmende Wirkung hat^{63, 81}:

In einer von Horstmann veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass MCS-18 eine starke, langanhaltende immunsuppressive Wirkung hat, indem es die Leukozyten-Infiltration ins Gehirn und ins Rückenmark stark reduziert. Dies würde MCS-18 als idealen Wirkstoff zur Therapie von Krankheiten mit überaktiviertem Immunsystem erklären. MCS-18 hat im Mäusemodell auch bei oraler Applikation seine Wirksamkeit bewiesen^{48,54}.

Auch die Studie von Seifarth bestätigt eine effiziente immunsuppressive Wirkung von MCS-18 bei autoimmun-induziertem Typ-I Diabetes in einem NOD-Maus Modell. Dabei werden die T-Zell-Infiltrate und Proliferate signifikant reduziert⁹³.

Neacsu et. al. zeigten an einem Rattenmodell die Wirksamkeit von MCS-18 als spezifischer, reversibler Capsaicin-Rezeptor Antagonist. Dabei inhibiert MCS-18 die

intrazelluläre Erhöhung der Kalzium-Konzentration, welche durch Capsaicin, nicht jedoch durch Hitze hervorgerufen wurde⁸¹.

Es ist jedoch weiterhin sehr wenig bekannt über die immunmodulatorische Wirkung von MCS-18. In einer Studie mit Mäusen konnten mehrere positive Effekte von MCS-18 bei entzündlichen und autoimmunen Krankheiten aufgezeigt werden. In einem Mäuseversuch fand Littmann et. al. heraus, dass MCS-18 die B-Zell-Proliferation und Immunglobulin-Produktion reduziert. Weiter belegt die Studie, dass MCS-18 die Ausschüttung wichtiger Moleküle hemmt, welche von Knochenmark stammenden, dendritischen Zellen (BM-DC) gebildet werden, sowie die T-Zell-Stimulation beeinträchtigt⁶⁰.

Die immunmodulierende Wirkung von MCS-18 wurde in zwei weiteren Studien an ApoE-defizienten Mäusen erforscht: Atherosklerose wird durch Entzündung beschleunigt, so kann MCS-18 die Reifung von dendritischen Zellen zur Unterdrückung einer übermässigen inflammatorischen Immunantwort hemmen:

Kuehn et. al. zeigte 2016 in ihrer Studie eine Unterdrückung der proatherogenen Leukozyteninteraktion durch MCS-18, dabei konnte ein signifikanter Anstieg des Kollagengehalts im Plaquegewebe der thoracoabdominalen Aorta nachgewiesen werden⁵⁷.

Dietel & Münch et. al. konnte in ihrer Studie aufzeigen, dass MCS-18 die Initiation von Atherosklerose in ApoE-defizienten Mäusen unterdrückt. Zudem verringerte sich der Anteil von reifen dendritischen und zytotoxischen T-Zellen in der Milz und deren Migration in atherosklerotische Läsionen. MCS-18 zeigte dabei keinen Einfluss auf die Plaquemigration und Milzproliferation von T-Helferzellen. Im Serum hingegen konnte eine reduzierte Konzentration von Zytokinen (u.a. IL-6) nachgewiesen werden, was wiederum für eine entzündungshemmende Wirkung von MCS-18 spricht²⁶.

4.1.2 Pharmakologisch-toxikologische Studien

Im toxikologischen Labor des Nationalen Arzneimittelforschungsinstitutes in Bukarest (RO)² wurde MCS-18 auf seine Toxizität hin bei Ratten und Mäusen geprüft. Die Studie wurde in drei Teilen durchgeführt:

- a) Akute Toxizität (einmalige Applikationen i.m. und i.v.)
- b) Subakute Toxizität (wiederholten Applikationen i.m.)
- c) Mutagene Potential

Es konnte eine sehr geringe akute Toxizität von MCS-18 nachgewiesen werden. Weiter konnte weder eine klastogene (chromosomenbrechende) noch aneugene (chromosomenabspaltende) Wirkung nachgewiesen werden, d.h. es bestehen keine Anzeichen von Mutagenität und zellulärer Toxizität. Daraus kann eine grosse Sicherheit bei der Anwendung bei Mensch und Tier gewährleistet werden².

4.2 Osteoarthritis

Osteoarthritis ist nicht nur beim Menschen, sondern auch bei älteren Pferden eines der häufigsten Gesundheitsprobleme und Hauptgrund für deren Euthanasie. Die Prävalenz bei über 15-jährigen Pferden liegt bei >50%, bei über 30-jährigen Pferden bei 80-90%. Equine Osteoarthritis wird als eine Gruppe von Krankheiten definiert, die durch eine fortschreitende Verschlechterung des Gelenkknorpels, der Knochen und Weichteilgeweben des Gelenks definiert ist. Dafür verantwortlich ist eine Störung der Gelenkhomöostase, d.h. es besteht ein Ungleichgewicht der anabolen und katabolen Prozesse im Gelenk. Die Behandlung von Osteoarthritis ist somit ein wichtiges Anliegen im Tierschutz^{111, 112}.

Osteoarthritis ist eine fortschreitend verlaufende, degenerative Erkrankung, welche mit einer Entzündung der Synovialmembran und Schädigung und Verlust des hyalinen Gelenkknorpels einhergeht⁴¹. Auslösende Faktoren können angeborene und wachstumsbedingte Ursachen (Chondrodysplasie und Fehlstellungen) als auch Fehlbelastungen und traumatische Schädigungen des Gelenkknorpels und des subchondralen Knorpels sein, welche Änderungen im Stoffwechsel der Knorpelzellen verursachen¹⁴. Die damit einhergehenden gestörte Homöostase führt zu einem Knorpelabbau¹⁰⁴. Dabei werden proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF- α)⁶⁷ freigesetzt, die durch Stimulation von Cyclooxygenase (COX2) eine Synthese von Prostaglandin E₂ (PGE₂), bzw. Stickoxid (NO) induziert durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS)¹¹². Dabei wird die Bildung von Metalloproteinasen (MMPs)⁴¹ induziert, die das Proteoglykannetzwerk zerstören⁷⁵. Daneben werden aber auch antiinflammatorische Zytokine (IL-4, IL-10, IL-13 und Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1Ra) produziert^{3, 42, 67}.

Es gibt bisher zahlreiche Studien, die den Entzündungsmediatoren eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der Osteoarthritis einräumt. Die Quelle der Mediatoren sind einerseits lokal die Gelenkzellen selbst, andererseits auch andere Zellen, wie Synoviozyten und solche, die über Fettgewebe und Blutbahnen die subchondralen Knochengefäße erreichen⁶.

Bei Untersuchungen der Synovial-Membran konnten Ansammlungen von Lymphozyten und Plasmazellen, als unspezifische Reaktion gefunden werden^{72, 73}. Dabei gab es keine Hinweise auf ein immunologisches Geschehen, wie dies z.B. bei der rheumatoiden Arthritis (chronische Polyarthritis) des Menschen vorkommt.

4.3 Knorpel

Die Gelenksflächen bestehen aus hyalinem Knorpel, der sich aus Chondrozyten und Knorpelgrundsubstanz (Matrix, Interzellulärsbstanz, Extrazellulärmatrix (EZM)) zusammensetzt. Dabei beträgt der Anteil der zellulären Komponente nur etwa 1-12%, abhängig von der Lokalisation innerhalb des Gelenkes und der Tiefe in Bezug auf die Oberfläche. Die EZM besteht aus Wasser (altersabhängig ca. 70-80%), Kollagen (ca.

50%*), Proteoglykanen (PGs) (ca. 35%*) und Glycoproteine (10%)⁷⁵. Weitere Bestandteile sind: kleine Proteoglykane (Biglykan, Decorin, Fibromodulin), Kollagen des Typs I, V, VI, IX, X, XI, Link-Proteine, Annexin, Hyaluronan, Fibronectin und Lipide^{50, 68}.

Damit ein Gelenk reibungslos funktioniert, muss eine stabile Homöostase, in welcher anabole und katabole Prozesse ausgeglichen sind, gewährleistet werden. Es ist mittlerweile bekannt, dass sich auch Knorpelgewebe, wenn auch nur sehr langsam konstant remodelliert⁷⁵.

Die Ernährung des gefäss- und nervenfreien Gelenkknorpels erfolgt durch molekularen Transport per Diffusion zwischen Matrix und Synovia^{27, 50, 74,69}, sowie durch die mechanische, kompressionsinduzierte Konvektion der Interstitialflüssigkeit¹⁰⁷.

Ex-vivo kann die Chondrozytenbiologie in einer organisierten Struktur mittels Explant-Kulturen untersucht werden. Die Zell-Matrix-Wechselwirkung kann so unter nahezu in-vivo Bedingungen untersucht werden^{39, 120}.

4.3.1 Extrazellulärmatrix

4.3.1.1 Kollagen Typ II

Im Gelenkknorpel kommt v.a. Fibrillen des Kollagen Typs II vor, welches aus 3 identischen Proteinen besteht. Diese wiederum bestehen jeweils aus 1'000 Aminosäuren ($\alpha 1$ -Ketten), welche in Form einer rechtsgedrehten Tripelhelix um einander gewunden sind. Die $\alpha 1$ -Ketten bestehen aus ca. 330 Glycin-X-Y-Wiederholungen, in welchen die X und die Y meist Prolin oder Hydroxyprolin, manchmal aber auch andere Aminosäuren bilden. Die freien endständigen N- und C-Telopeptide sind wichtige Querverbindungsstellen, durch die sich die Kollagen-Moleküle untereinander oder mit anderen Molekülen verbinden. Auf diese Weise ordnen sich die Kollagen-Typ II-Moleküle zu grossen fibrillären Strukturen an, die von entscheidender Bedeutung für die mechanische Eigenschaft von Gelenkknorpel sind.

Gelenkknorpel hat eine hochorganisierte Struktur, die aus 4 Zonen³⁹ besteht:

- a) Oberflächliche Zone (tangential oder gleitend), bestehend aus dünnen Kollagenfibrillen mit einer hohen Konzentration von Decorin und einer geringen Konzentration von Aggregan,
- b) Mittlere Zone (Übergangszone) mit radialen Bündeln dicker Kollagenfibrillen
- c) Tiefe Zone (radial), in der die Kollagenbündel am dicksten und dabei radial angeordnet sind.
- d) Verkalkte Zone bleibt nach dem Verschluss der Epiphysenfuge als Markierungslinie bestehen. Sie stellt ein wichtiger mechanischer Puffer zwischen nicht verkalktem Knorpel und subchondralem Knochen dar.

* bezogen auf die Trockenmasse

Die Zelldichte nimmt von der oberflächlichen zur tiefen Zone progressiv ab, dabei steigt das Zellvolumen und der Anteil an Proteoglykanen gegenüber dem Kollagen an.

Die Chondrozytenform und die Matrixstruktur variieren zwischen den verschiedenen Zonen. Der Kollagengehalt ist in der oberflächlichen Zone am grössten¹³. Die Funktion des Knorpels kann mit Stahlstäben in Stahlbeton verglichen werden⁷⁵: Die Kollagenfasern verlaufen in den oberflächlichen Knorpellagen parallel, biegen sich in den tieferen Lagen arkadenförmig um und strahlen dann fast senkrecht in den subchondralen Knochen ein.

4.3.1.2 Proteoglykane (PG)

Proteoglykane bilden neben Kollagen II und Wasser eine weitere Hauptkomponente der Knorpel-EZM. Dabei handelt es sich um grossmolekulare Substanzen, welche zu 95% aus Kohlenhydraten und aus 5% aus Proteinen bestehen. Sie haben ein Molekulargewicht von >2 Millionen Dalton und ihre chemischen Eigenschaften entsprechen aufgrund ihres hohen Kohlenhydrat-Anteils, der von Polysacchariden. Die Synthese der Proteoglykane erfolgt am rauen endoplasmatischen Retikulum und werden nach der posttranslationalen Modifizierung im Golgi-Apparat in den Extrazellulärraum abgegeben. Aufgrund ihrer hohen Wasserbindungsfähigkeit fungieren Proteoglykane in Gelenken als Gleitmittel, sowie als raumfüllende Grundsubstanz in der Extrazellulärmatrix in Knorpel und Sehnen. Sie sind verantwortlich für den beträchtlichen hydrodynamischen Druck im Knorpelgewebe, welches unter konstanter Beanspruchung ist⁸².

Proteoglykane lagern sich zwischen den Kollagenfibrillen, entweder direkt oder über Hyaluronsäure an die Kollagen-Fibrillen an. Im hyalinen Knorpel weisen die PGs Chondroitinsulfat-Seitenketten auf, deren bekanntesten und am besten erforscht die Aggrecane sind. Aggrecane binden sich intensiv über eine N-terminale Region an Hyaluronsäure, was wiederum die Festigkeit des Knorpels ausmacht¹⁰⁹. Weitere Seitenketten sind Versicane, Neurocane und Brevicane⁷⁵.

Nach Stimulation mit LPS kann in der ersten Zeit nach Stimulation eine signifikante Erhöhung von neuproduzierten Proteoglykanen nachgewiesen werden. Dies kann eine reparative Antwort auf die Entzündung sein. Eine kontinuierliche Veränderung in der qualitativen Zusammensetzung von PG zu einem späteren Zeitpunkt könnte eine Veränderung des Chondrozyten Metabolismus darstellen, der eine Neubesiedelung der bestehenden Knorpelmatrix bezweckt⁸⁵.

Proteoglykane werden durch Metalloproteinasen abgebaut (siehe auch unten im Kapitel „Matrix Metalloproteinasen“).

4.3.2 Matrix Metalloproteinasen

(nachfolgend für diese Arbeit nur MMP-1 und MMP-3)

Proteinasen sind Enzyme, welche durch Hydrolyse Peptidbindungen von Proteinen spalten können (Proteolyse). Je nach Wirkungsmechanismus werden die Proteinasen in Untergruppen (Clans) unterteilt, eine davon sind die Metalloproteinasen, welche ein

Zink-Ion und Metionin im aktiven Zentrum besitzen. Gemäss der GenBank des National Biotechnology Information Center (USA) wurden bis jetzt 25 verschiedene MMPs gefunden, wovon 24 in Säugetieren vorkommen⁸⁸.

Die Produktion von MMPs erfolgt in inaktivierter Form (pro-MMPs). Durch Spaltung werden sie aktiviert. Vier Mechanismen beeinflussen Konzentration und Aktivität von MMPs³⁶:

- Induktion oder Inhibition der Gen-Expression
- Speicherung der Enzyme innerhalb oder ausserhalb der Zellen
- Produktion von Pro-Enzymen, welche aktiviert werden müssen
- Inaktivierung der aktiven Form

Für die Aktivierung der MMPs sind Zytokine (z.B. TNF), Interleukine, inflammatorische Zellen, Wachstumsfaktoren, oxidativer Stress, Hormone, das sympathische System oder direkte mechanische Stimuli verantwortlich²⁵. Inaktiviert werden MMPs durch körpereigene Enzyme, sogenannte TIMPs (Tissue Inhibitor der Matrix Metalloproteinasen).

Matrix Metalloproteinasen (dazu gehören unter anderem Kollagenase (MMP-1), Stromelysin (MMP-3) und Gelatinase (MMP-2)) werden von ganz verschiedenen Zellen sezerniert, so z.B. Synoviozyten, Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen und Chondrozyten. Ihre Funktion besteht vor allem in der Aufgabe des Knorpelabbaus, d.h. dem Abbau von extrazellulärer Matrix (z.B. Proteoglykane⁵⁸, Kollagen und Aggrecan)^{114,96}. Sie spielen somit auch eine Hauptrolle bei Gelenkerkrankungen^{72, 73}.

Die Extrazelluläre Matrix (EZM) von Gelenksknorpel unterliegt einem dauernden Auf- und Abbau, um Wachstum und Regeneration zu gewährleisten. Dieser Abbau wird durch Matrix Metalloproteinasen verursacht, deren proteolytische Aktivität v.a. durch ihre Gewebsinhibitoren (TIMPs) kontrolliert wird. MMP und TIMPs existieren in einem Zustand eines dynamischen Gleichgewichts, mit einem leichtgradigen Übergewicht des einen oder anderen, je nachdem, ob Extrazellulärmatrix (Proteoglykane²⁷) auf- oder abgebaut werden soll. Langanhaltende Störung dieses Gleichgewichts haben pathologische Konsequenzen, so kann z.B. bei einer Osteoarthritis eine erhöhte MMP Aktivität beobachtet werden. Eine zu tiefe MMP-Aktivität kann die Wundheilung verzögern, indem sie die Fibrinolyse und die Beseitigung von Narbengewebe verhindert²¹.

Die Metalloprotease-Aktivität wird durch die Induktion der Stickstoff (NO)-Synthaseaktivität in Chondrozyten verursacht. Dabei korrelieren die NO-Synthaseaktivitäten mit erhöhten MMP-Aktivitäten. Dies kann auch durch exogen induziertes NO beobachtet werden⁸⁰.

4.3.2.1 Kollagenase (MMP-1)

Kollagenase (MMP-1) wurde von Fullmer und Gibson in humaner Gingiva erstmals beschrieben³⁷. Zu der Gruppe der Kollagenase gehören ausser MMP-1 auch MMP-8, MMP-13 und MMP-18. Hauptmerkmal dieser Enzyme ist ihre Fähigkeit, interstitielle Kollagene I, II und III an einer spezifischen Stelle dreiviertel vom N-Terminus

abzuspalten. Die Kollagenase können auch weitere Extrazellulär- und Nicht-Extrazellulärmatrix-Moleküle verdauen¹¹³. Brama et. al. konnten einen altersbedingten Rückgang von MMP-1-Aktivität in Synovia feststellen. Dabei war die MMP-Konzentration in fetaler Synovia 15-fach höher als bei Jungtieren, welche wiederum signifikant höhere MMP-1-Aktivität als erwachsenen Pferden zeigten. Dies weist auf eine hohe metabolische Aktivität während schnellem Wachstum hin, während das Training der Pferde keinen Einfluss hatte. So könnten erhöhte MMP-1-Konzentrationen in Synovia diagnostisch oder therapeutisch genutzt werden⁹.

4.3.2.2 Stromelysin (MMP-3)

Stromelysin (MMP-3) wurde in Fibroblasten-Kulturen aus Kaninchenknochen von Werb und Reynolds 1974 entdeckt¹¹⁹. Es wurde damals Proteoglykanase genannt. Später wurde es in „Stromelysin“ umbenannt¹⁶.

MMP-3 (Stromelysin) scheint zusammen mit Aggrecanase hauptverantwortlich für den Abbau von Proteoglykanen zu sein, spielt also bei der Entstehung von OA eine wichtige Rolle⁷. In einer Studie stellte Leong et. al. während der Immobilisation der Hinterextremität bei Nagern einen Proteoglykanverlust in Verbindung mit erhöhtem MMP-3 fest. Bei nicht-immobilisierten Tieren konnte dies verhindert werden⁵⁸. Blom et al. konnte in einer Studie mit Mäusen zeigen, dass die frühe MMP-Aktivität von synovialen Makrophagen ausgeht und nicht von Chondrozyten⁷.

Sowohl LPS wie auch IL-1 vermögen MMP-3 signifikant zu erhöhen⁸⁶.

4.4 Zytokine

Der Begriff Zytokine leitet sich aus dem Griechischen Zyto (Zelle) und Kinese (Bewegung) ab. Es bedeutet „sich zwischen den Zellen bewegend“. Zytokine sind hormonähnliche Wirkstoffe, die meist durch eine Stimulierung produziert werden und an ihrer Zielzelle viele verschiedene Funktionen in Gang setzen. Viele Zytokine konnten in den letzten Jahrzehnten identifiziert werden. Sie regulieren Prozesse der Ontogenese, der Gewebsreparatur, Zellteilungsprozessen, der Immunabwehr⁶², der Entzündung, der Kontraktilität in Herz und Gefäßen, der Aufrechterhaltung der Körperprozesse und des Zelltods. Zytokine sind als regulatorische Proteine, welche von Leukozyten und weiteren Zellen produziert werden⁶¹.

Die wichtigsten katabolen Zytokine sind IL-1 und TNF- α , die aus Chondrozyten und Synoviozyten sezerniert werden können. Bei beiden wurde gezeigt, dass sie bei Arthrose hochreguliert werden, was die Produktion von MMP (positiv und negativ²⁷), Stickstoffmonoxid und Prostaglandin E2 (PGE2) sowie die Inhibition von Aggrecan und Typ II-Kollagensynthese fördert⁷². In vitro scheinen sich die IL-1 und TNF- α Moleküle gegenseitig zu potenzieren³⁵.

Der Gelenksknorpel weist eine hohe anabole und katabole Aktivität auf. Verschiedene Faktoren (u.a. Interleukin-1 (IL-1) und Lipopolysaccharide (LPS)), die an der Pathogenese von equinen Knorpelerkrankungen beteiligt sind, stimulieren die

Produktion von PGE₂. Zudem wurde in erkranktem Knorpel eine erhöhte Synthese von Proteoglykanen durch Knorpelzellen nachgewiesen^{39, 70}.

4.4.1 Interleukin 1 (IL-1)

Interleukine gehören zu den ersten (Ende der 1970er Jahre) beschriebenen Zytokinen. Es wurde als Monokin bezeichnet, weil es von Monozyten produziert wird. Der Name Interleukin leitet sich von „Mediatoren zwischen den Leukozyten“ ab. IL-1 (zusammen mit IL-2) wurden durch ihre Eigenschaft, Lymphozytenproliferation zu stimulieren charakterisiert. IL-1 hat unzählige Funktionen und wird „pleiotrop“ (multifunktionell) genannt. So wurde IL-1 von verschiedenen Forschungsgruppen unter unterschiedlichen Namen beschrieben, u.a. als endogenes Pyrogen, Lymphozyten-aktivierender Faktor oder Leukozyten Endogener Mediator. Ihre Funktion liegt v.a. in der Immunregulation, sie reicht über die Stimulierung weiterer Zytokine, Produktion anderer Mediatoren oder Proliferation und Exprimierung von Membranenzymen. IL-1-Rezeptoren werden der Klasse IV-Zytokinrezeptoren zugeordnet⁶¹.

IL-1 existiert in zwei Isoformen (IL-1 α : 159 Aminosäuren und IL-1 β : 153 Aminosäuren), dessen Aminosäuren Zusammensetzung in weniger als 30% übereinstimmt. Beide Isomeren binden an dieselben Rezeptoren^{40, 118} und verfügen darum über eine ähnliche biologische Aktivität. IL-1 ist ein sehr potentes Zytokin bei der Knochen- und Knorpelzerstörung, weiter hemmt es die Knorpelsynthese, indem es die Synthese von Metalloproteinasen, Prostaglandinen (PGE₂) und Stickoxid (NO) und damit den Abbau von Makromolekülen der Knorpelmatrix fördert. Daneben stimuliert IL-1 die Osteoklasten und die Proliferation von Synovialzellen.

Als natürlicher Antagonist von IL-1 β vermag Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist IL-1 β kompetitiv zu binden und zu blockieren³. Für eine wirkungsvolle Inhibition von IL-1 β ist jedoch aus humanmedizinischen Studien bekannt, dass ein bis zu 100 bis 2'000-facher Überschuss an IL-1Ra gegenüber IL-1 β im Gelenk vorliegen muss⁶⁷.

IL-Ra kommt sowohl in Synovia von gesunden Pferden wie auch im Stadium früher Knorpeldegenerationen vor. Jedoch kann bei chronischen Knorpeldegenerationen kein IL-1Ra mehr nachgewiesen werden. In Gelenkknorpel stimuliert IL-1 die IL-6-Synthese in den Chondrozyten und hemmt zusammen mit IL-6 die Proteoglykan-Synthese¹¹⁴.

In einer Studie von Hardy konnte gezeigt werden, dass durch eine intraartikuläre Injektion von IL-1 β eine signifikante neutrophile Leukozytose ausgelöst werden konnte. Dabei sank die intraartikuläre IL-1 β Konzentration nach 5,5h wieder auf den Ausgangswert zurück. Ein darauffolgender Anstieg von endogenem IL-1 β konnte dabei nicht festgestellt werden. Die IL-6-Konzentration stieg jedoch während des Weiteren Studienverlaufs signifikant an. Die Zellantwort auf IL-1 β erfolgte somit schnell und anhaltend⁴⁴.

IL-1 kommt zusammen mit IL-6 auch in gesundem Knorpel in sehr niedrigen Konzentrationen vor. Bei Osteoarthritis finden sich nur minim erhöhte IL-1

Konzentrationen. Die katabolische Signal-Kaskade wird durch externes IL-1 aus der Synovia von Chondrozyten, welche in den obersten Zellschichten des osteoarthritischen Gelenkknorpels liegen, aktiviert³⁰.

IL-1 induziert weiter die Freisetzung von Metalloproteinase-Vorstufen, wie Stromelysin (MMP-3) und Kollagenasen (MMP-1, MMP-13). Da IL-1 eines der wichtigsten katabolen Zytokine bei der rheumatoiden Arthritis spielt³⁰ sollte die Therapie von Arthritiden und Arthrosen auf eine Neutralisation von IL-1 und die Förderung von sicheren anabolen Wachstumsfaktoren (z.B. Insulinlike Growth Factor (IGF-1)) für den Gelenkknorpel gerichtet sein¹¹⁰.

4.4.2 Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 wird von verschiedensten Zellarten produziert, v.a. vom Lymphozyten (B- und T-Zellen), aktivierten Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, Fibroblasten, Adipozyten, Keratozyten, Endothelzellen, Osteoklasten, Astrozyten und von Zellen des Hypophysenvorderlappens, in vitro nach Endotoxin-Inkubation oder TNF exprimiert^{55, 76, 77}. IL-6-Rezeptoren gehören zur Zytokinrezeptorklasse I⁶¹. Neben IL-1 und weiteren Zytokinen vermittelt IL-6 zwischen lokalen Entzündungsreaktion und der systemischen Akutphasen-Reaktion⁴⁶. IL-6 wirkt als endogenes Pyrogen und sowohl die humoralen, wie auch die zellulären Abwehrmechanismen werden durch IL-6 stimuliert⁴⁵. IL-6 gehört zu den pleiotropen Hormonen, welche u.a. die Immunantwort, die Akutphase-Reaktion, die Hämatopoese und die Hämostase reguliert⁵⁵. IL-6 spielt eine wichtige Rolle in der Modulation des Entzündungsgeschehens. So konnte durch eine quantitative real-time-PCR der mRNA von IL-6 eine erhöhte Expressierung bei einer Entzündung in subchondralen Knorpelzysten bewiesen werden^{114, 115}. Die höchste Aktivität von IL-6 konnte nach Verabreichung von Endotoxin auf equine Peritonealmakrophagen nach 6-12 Stunden nachgewiesen werden⁷⁶.

Equine IL-6-Moleküle sind derer anderer Säugetierspezies sehr ähnlich. Die für die Bioaktivität verantwortlichen Aminosäuresequenzen von humanem IL-6 sind auch in equinem IL-6 vorhanden¹⁰⁵.

Bei 2-3 Tage alten Fohlen zeigt sich bereits nach 30 Minuten ein signifikanter IL-6 Anstieg im Serum durch parenterale Verabreichung von LPS. Die höchsten IL-6-Werte werden 90 Minuten nach Applikation gemessen, dabei war die IL-6 Expression abhängig von der Kolostrum-Versorgung, wobei bei Kolostrum-Gabe die IL-6 Maximalwerte deutlich höher lagen, als ohne Kolostrum-Gabe⁹⁰. Bei adulten Tieren verursacht eine intravenöse LPS-Applikation eine IL-6 Antwort innerhalb der ersten acht Stunden nach Injektion^{11, 76}. Der Ausgangswert wird ca. nach 18 bis 24 Stunden wieder erreicht. Bei parenteraler Verabreichung von einer 30-fach höheren Endotoxindosis erkennt man eine Korrelation zwischen Endotoxinmenge und IL-6⁶⁵.
Plasma

4.5 Lokale Mediatoren

Zu den wichtigsten Vertretern von lokalen Mediatoren, die den Stoffwechsel von Knorpel, Knochengewebe und andere Zellarten beeinflussen, gehören Stickoxid (Nitric Oxide (NO)) und Prostaglandin E2 (PGE₂)²⁹. Sowohl LPS wie auch IL-1 vermögen NO, iNOS⁵ und PGE2 signifikant zu erhöhen⁸⁶.

4.5.1 Stickoxid (NO) und iNOS

Stickoxid (NO) ist chemisch ein gasförmiges, anorganisches freies Radikal¹⁰⁰, das u.a. von Gelenkknorpelzellen produziert wird. Es wird dabei aus Arginin durch Stickoxid-Synthase (NOS) synthetisiert. Der Effekt von NO ist sehr schnell, lokal und möglicherweise toxisch⁷⁹.

Studien mit verschiedenen Spezies, u.a. auch beim Pferd³³, haben gezeigt, dass eine erhöhte NO-Aktivität als Mediator von Gelenkknorpelschäden beteiligt sein könnte und über die Induktion von Metalloproteinasen (MMPs)⁸⁰ die Neubildung von Knorpelmatrix hemmt¹. NO könnte somit als Schlüsselprotein bei der Bildung von Knorpeldegeneration angesehen werden⁸⁰, folglich wäre eine geeignete therapeutische Reduktion der NO-Synthese (iNOS) wünschenswert^{20, 91}.

Eine Assoziation mit der Aktivierung von MMPs und der Reduktion deren natürlichen Inhibitoren (TIMPs) wurde auch mit Stickoxid beobachtet, dabei ist die spezifische Rolle, die dieses Molekül bei Osteoarthritis spielt, noch immer umstritten^{12, 35, 84}.

Feelisch vermutet, dass NO nicht ein ausschliesslich rein destruktiv wirkender Mediator ist. Dafür sind aber noch weitere Studien nötig, um zu beurteilen, ob die endogene NO-Produktion eher gehemmt oder verstärkt werden müsste³².

4.5.2 Prostaglandine (PGE₂) und Cox-2

Prostaglandine sind ungesättigte Fettsäuren, welche lokal wirken, welche als lokale Hormone bezeichnet werden. Die Synthese von Prostaglandinen erfolgt hauptsächlich über die Cyclooxygenase (Cox). Arachidonsäure wird dabei mittels Phospholipase-A2 aus den Phospholipiden der Zellmembran freigesetzt und durch das Enzym Prostaglandin G/H-Synthase-2 (Cox-2) in Prostaglandin umgewandelt.

Cox-2 katalysiert die Umwandlung von Arachidonsäure in PGE₂⁵⁶. Dabei kann die Menge an Cox-2 als Parameter für die Expression von PGE₂ angesehen werden, da die Bildung von PGE₂ hauptsächlich über den Zylooxygenase-Weg verläuft³⁸.

Mit der Verminderung der anabolen Synthese im Gelenk ist auch PGE2 assoziiert. So konnte aufgezeigt werden, dass PGE2α in Synovia von Pferden mit klinischer OA erhöht ist und dass PGE2 auch in-vitro nach Stimulation mit IL-1 und TNFα vermehrt produziert wurde^{35, 72}.

Die Hemmung von PGE₂ wurde in den letzten Jahrzehnten als sinnvolles Ziel zur Schmerzlinderung, bzw. Symptombekämpfung angewendet. Damit einhergehende Knorpelschädigungen können nicht ausgeschlossen werden.

Je nach physiologischer Umgebungsbedingung kann PGE₂ sowohl einen anabolen wie auch einen katabolen Effekt auf Knorpelzellen haben. Exogenes PGE₂ (10mg/ml) vermag eine IL- β -induzierte Expression von MMP-1, MMP-3 und MMP-13 signifikant zu reduzieren¹⁰⁸.

In einer Studie mit menschlichen Chondrozyten konnte gezeigt werden, dass eine selektive Hemmung von Cox-2 einen Chondrozytenzelltod durch den NO-Generator Natrium-Nitroprussid (SNP: sodium nitroprusside) verhindert. Ein durch SNP verursachten Chondrozytenzelltod war assoziiert mit einer Überproduktion von COX-2 Proteinen und einer Erhöhung von PGE₂. Analysen von Interaktionen zwischen PGE₂ und Zelltod zeigten, dass PGE₂ den SNP-vermittelten Zelltod fördert, während PGE₂ allein zu keinem Zelltod führt. Dies zeigt, dass exogenes PGE₂ Chondrozyten für einen NO-induzierten Zelltod sensibilisieren⁸³.

Briston et. al hat gezeigt, dass bei LPS stimulierten Knorpel-Kulturen die PGE₂-Exprimierung altersabhängig ist. So zeigten die Altersgruppe <10 Jahre die geringste und die Altersgruppe >20 Jahre die grösste Empfindlichkeit¹⁰.

In einer Studie von de Grauw konnte in-vivo gezeigt werden, dass eine Injektion von 0.5ng Lipopolysaccharid ins Karpalgelenk bei 6 Pferden die PGE₂-Konzentration der Synovia 8 Stunden nach Injektion am höchsten ist, während die Matrix Metalloproteinase Aktivität nach 8 Stunden zu steigen beginnt, nach 24 Stunden den höchsten Wert erreicht und nach 168 Stunden wieder auf den Basiswert zurückfällt²³.

4.6 Lipopolysaccharid (LPS)

Lipopolysaccharid (LPS) sind in der äusseren Membran gramnegativer Bakterien enthalten. Es besteht aus einem hydrophoben Teil, genannt Lipid A (oder Endotoxin), einer Kern-Oligosaccharid und einem Polysaccharid (oder O-Antigen) und ist eine thermostabile Verbindung. LPS wirken als Antigene und dienen der serologischen Charakterisierung und Identifizierung von Bakterien. Beim Zerfall der Bakterien wirkt freiwerdendes LPS in einem Organismus toxisch⁸⁹.

LPS wurde in diversen Studien zur Auslösung einer Arthritis in-vivo^{23, 106} wie auch in-vitro durch Stimulation von Zellkulturen verwendet, dabei wurden Stimulationen von NO^{33, 64, 70} und PGE₂^{64, 112} provoziert⁸⁶.

5. Material und Methoden

Das Labormaterial sowie weitere Routinechemikalien stammen von Sigma Chemie, oder Fluka, Buchs (CH). Weitere spezielle Reagenzien wurden wie folgt bezogen:

Ham's F12, Kulturmedium	Gibco, Invitrogen AG, CH-Basel	21765-029
Penicillin-Streptomycin (Peni/Strep) (5'000 units/ml)	Gibco, Invitrogen AG, CH-Basel	15070-063
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma, CH-Buchs	L-2880
Gey's Balanced Salt Solution (GBSS)	Sigma, CH-Buchs	G-9779
Makrozyklisches Carbon Suboxid aus Helleborus purpurascens (MCS)	Donatur GmbH, D-Martinsried	

Proben

Die Pferde wurden von der Metzgerei Müller in Niederglatt/ZH geschlachtet. Es wurde Knorpel von folgenden Pferden verwendet:

Versuch/ Proben	Rasse*	Alter*	Geschlecht*	Schlachtgrund*
V B	Unbekannt	Unbekannt	Unbekannt	Aus Altersgründen
V C	Warmblut	7	Unbekannt	Headshaking
V D	Warmblut	Unbekannt	Unbekannt	Strahlbeinlahmheit
H 1-8	Warmblut	7	Wallach	Kreuzschlag
H 9-16	CH-Warmblut	12	Hengst	Knieprobleme
H 17-24	Warmblut	9	Stute	Unbekannt
H 25-32	Poln. Warmblut	15	Stute	Starke Lahmheit
H 33-40	Freiberger	10	Wallach	Strahlbeinlahmheit
H 41-48	Warmblut	9	Wallach	Strahlbeinlahmheit

* Alle Angaben vom Metzger H: Hauptversuch; Nr.: Probennummer; V: Vorversuch

Nach der Schlachtung wurde der Knorpel aus den Fesselgelenken spätestens nach 6 Stunden entnommen. Dazu wurden die Pferdevorderbeine, die am Karpalgelenk vom Pferdekörper abgetrennt wurden, in eine Spannvorrichtung gespannt. Mit einer Skalpellklinge Nr. 22 wurde die Haut entfernt, die Strecksehnen, sowie die Kollateralbänder des Fesselgelenkes durchtrennt und das Gelenk steril eröffnet. Mittels chirurgischer Pinzette und Skalpellklinge wurde der Gelenkknorpel des Fesselgelenkes abgeschält und in eine, mit GBSS vorbereitete Petri Schale verbracht. Von jedem Probenmaterial wurde jeweils eine Probe in Formalin eingelegt, eingebettet, HE-gefärbt und mikroskopisch beurteilt.

Für die Zellkulturen wurden möglichst genau 200 mg Knorpel abgewogen, die Gewichte genau notiert, in ca. 4 mm² grosse Stücke zerhackt und mit 2 ml des jeweiligen Mediums (gemäss *Tabelle 1*) in 6-Loch-Platten angesetzt. Für das Stimulations-Medium wurde jeweils eine LPS-Lösung (10 mg LPS pro ml F12) und eine MCS-Stock-Lösung (1 mg MCS-18 pro 10 ml F12), die in der jeweiligen Konzentration (siehe Kapitel 5.2. und 5.3.) verwendet wurde, angesetzt. Als Zusatz wurde jeder Medium-Lösung pro ml 0,01 ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt.

Tabelle 1

Gruppe	Stimulation	
1	Kontrolle	2 ml F12 + 0,02 ml Peni/Strep
2	LPS	2 ml F12 + LPS-Lösung (1µl/ml F12) + 0,02 ml Peni/Strep
3	MCS	2 ml MCS-Lösung* + 0,02 ml Peni/Strep
4	MCS-LPS	2 ml MCS-Lösung* + LPS-Lösung (1µl/ml MCS Lösung) + 0,02 ml Peni/Strep

* in jeweiliger Konzentration (siehe Kapitel 5.2. und 5.3.)

Die Zellkulturen wurden bei 37° C in einem Inkubator mit 5% CO₂ Begasung inkubiert. 24 Stunden später erfolgte die Entnahme. Dazu wurden das Medium und der Knorpel jeweils separat in Eppendorfröhrchen abgefüllt und sofort bei –80° C tiefgefroren. Für die spätere PCR wurden jeweils 5 Knorpelstückchen mit RNAlater versetzt und nach 24-stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank (5°C) bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

5.1 Biochemische Analyse

Für die biochemischen Analysen wurden alle Proben im Doppel verwendet. Als Probenmaterial wurde Medium verwendet, ausser für die Bestimmung des Kollagens, für welche Knorpel genommen wurde.

5.1.1 NO

Als ein stabiles Produkt von NO, wird Nitrit spektrophotometrisch mit der Griess-Reaktion bestimmt^{43, 97, 114}. In einer Reaktion von zwei Schritten bildet Nitrit, das 51,5% ± 3,5% des ursprünglichen NO's darstellt, mit den beiden Griessreagenzien ein Azoprodukt, dessen Absorptionsmaximum photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen werden kann. Zur Berechnung der Konzentrationen wurde die optische Dichte (Microplate Reader, MR7000, Dynatech, CH-Embrach, Filter: 550nm) gemäss einer Standardreihe (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 und 128 µmol) herangezogen. Alle Reagenzien für die Standardlösungen, sowie für Griess Reagenz I und II stammen von der Firma Sigma, Buchs/CH.

5.1.2 PGE₂

Für die quantitative Bestimmung von Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Konzentration wurde, wie bereits für Pferde beschrieben^{44, 51, 114}, ein kompetitives Enzym-Immunoassay EIA-Kit (R&D Systems, PGE₂, Cat. Nr. DE0100) verwendet. Die Berechnung der

Konzentrationen erfolgte aufgrund der optischen Dichte (Microplate Reader, MR7000, Dynatech, CH-Embrach, Filter: 405nm) gemäss einer Standardreihe. Proben, deren Konzentrationen den messbaren Bereich überstiegen, wurden in verdünnter Konzentration wiederholt gemessen und entsprechend normalisiert.

5.1.3 Caseinolytische Aktivität (Stromelysin/MMP 3)

Als Substrat für die zu bestimmende caseinolytische Aktivität diente sogenanntes „Cold Casein“ (1,5 mg lyophilisiertes β -Casein [Sigma C6905] in 1 ml destilliertem Wasser) und „Hot Casein“, radioaktive, C-14-methylierte β -Casein-Indikatorsubstanz (Sigma C6034) (ca. 1'400 CPM pro 10 μ l Substrat). Zu den jeweiligen Teströhrchen wurde 20 μ l Probenmaterial und zur Positiv-Kontrolle 20 μ l Trypsin-Lösung (3 mg Trypsin [Worthington] pro 10 ml 1mM Salzsäure) hinzugefügt. Allen Teströhrchen sowie der Blindprobe wurde 10 μ l 100 mM Aminophenylquecksilberazetat (pH 11,5; Sigma A-9563) beigegeben und bis zu einem Endvolumen von 50 μ l mit einer Reaktion-Pufferlösung (pH 7,4), bestehend aus 4,79 mM Tris Base, 25,2 mM Tris-HCl, 200 mM Natriumchlorid (Fluka 71378), 5 mM Calciumchlorid (Sigma C 5670) und 3 mM Natriumazid (Sigma S 8032), aufgefüllt. Nach Zugabe von 20 μ l Substrat werden die Proben für genau 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen von 100 μ l 6% Trichloressigsäure und 50 μ l Cold Casein gestoppt. Die Probenröhrchen werden bei 12'000 RPM 10 Minuten zentrifugiert. Die Radioaktivität von jeweils 100 μ l des Überstands wurde in 3 ml Szintillations-Lösung (Highsafe 2, Perkin Elmer Life Science) 1 Minute im Szintillationszähler (Wallac 1414, Sinspectral Flüssigszintillationszähler, Perkin Elmer Life Science) gemessen. Als Totalproben wurde jeweils 10 μ l Substrat und 3 ml Szintillationsflüssigkeit mitgemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität basierte auf der Annahme, dass 1U Enzym 1 μ g Substrat pro Minute abbaut²⁸.

5.1.4 Kollagenolytische Aktivität

Die kollagenolytische Aktivität der im Probenmaterial vorhandenen Kollagenase wurde anhand deren Degradierungsfähigkeit von Fluoreszin-markiertem Kollagen bestimmt⁴. Die Wiederherstellung der Kollagenfibrillen erfolgt durch Polymerisation von unlöslichen Kollagenfibrillen. Dafür wurden für die Proben (vom doppelt angesetzten Probenmaterial wurden die Proben für diese Messung gepoolt), die Blindprobe und die Kontrolle 50 μ l bovine Fluoreszin-Kollagen-Lösung (Sigma C 5858) über 6 Stunden bei 35°C inkubiert. Jeder Testprobe wird darauf bis zu einem Endvolumen von 750 μ l eine Inkubations-Pufferlösung (50 mM Tris, 5 mM Calciumchlorid und 0,1% bovines Serum Albumin, bei pH 7,5 mit 0,1M HCl) beigegeben, dessen Volumen je nach Aktivität variieren kann. Die Blindprobe enthält 750 μ l Inkubations-Pufferlösung und die Totalprobe 700 μ l sowie 50 μ l Kollagenase-Lösung. Nach einer erneuten Inkubation von 16 Stunden bei 36°C wird ein Stop-Puffer (pH 7,5: 50mM Tris/HCl, 70mM EDTA (Fluka 03659)) zugefügt. Nach Zentrifugation wird die Aktivität des Überstands in einem Fluorometer bei einer Exzitations-Wellenlänge von 490 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 520 nm gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgt aufgrund der Annahme, dass 1U Enzym 1 μ g Substrat pro Minute abbaut. Die Gesamtaktivität über 16 Stunden entspricht somit 115 mU.

5.1.5 Kollagen

Durch eine Säurehydrolyse kann der Gehalt an Hydroxyprolin bestimmt und daraus das Gesamtkollagen von Knorpel errechnet werden^{92, 101}. Die Peptidbindung des Knorpels wird durch Natriumhydroxid (NaOH) (4M) bei 120°C hydrolytisch gespalten. Hydroxyprolin oxidiert mit Chloramin-T schrittweise zu Pyrrol, das zusammen mit p-Dimethylaminobenzaldehyd ein Chromophor bildet, dessen Absorption bei 540nm photometrisch gemessen wurde. Die Resultate werden gemäss den eingewogenen Gewichten normalisiert. Die Reagenzien wurden bei den Firmen Merck (Zug/CH), Fluka (Buchs/CH) und Sigma (Buchs/CH) bezogen.

Material

Folgende Lösungen wurden verwendet:

- Natrium hydroxide (NaOH)	Merck 6495	MG 40.0
- Zitronensäure Monohydrat	Merck 244	MG 210.14
- Chloramin T (N-Chloro-p-Toluen-Sulfonamid, Na-Salz)	Sigma C-9887	MG 227.65
- Essigsäure <98%	Fluka 45740	MG 60.0
- Natrium Azetat Trihydrat	Merck 6267	MG 136.08
- 4-Dimethylamino-Benzaldehyd (DMBA)	Fluka 39070	MG 149.19
- Perchlorsäure 60%	Fluka 77232	MG 100.46
- Gelatine Hydrolisat	Sigma G-0262	

Vorbereitung der Lösungen

Natriumhydroxid 4M in 250 ml dH₂O

Stammlösung 4M NaOH (Merck 6495), ca. 40g in ca. 200ml destilliertem Wasser auflösen, danach bis 250ml mit destilliertem Wasser auffüllen. Die Lösung wurde mit Millex GV 0.22µ gefiltert.

Zitronensäure 1,4 N in 250ml dH₂O

Zitronensäure 1x H₂O 1.4 N: 14.7g/50ml
Die Lösung wurde filtersterilisiert und bei 4°C gelagert.

Zitratazetat Puffer in 500ml dH₂O

- 1.4 N Zitronensäure 1xH ₂ O	25g
- Essigsäure <98%	6ml
- Natriumazetat trihydrat 3x H ₂ O	60g
- Natriumhydroxid	17g

Alles in ca. 450ml destilliertem Wasser auflösen, mit Hilfe von 4M NaOH auf einen pH von 6.0 einstellen. Danach mit destilliertem Wasser auf ein Totalvolumen von 500ml auffüllen, filtersterilisieren und bei 4°C lagern.

Chloramine T Lösung in 100ml Zitratazetat Puffer

- Chloramine T 1.41g in 80ml Pufferlösung
- dH₂O 10ml
- n-Propanol 10ml

Alles auflösen und bei 4°C in braunen Flaschen aufbewahren (die Lösung ist lichtsensitiv).

Aldehyd-Perchlorsäure-Reagenz	10	20	30	40	Probennr.
- DMBA	0.75	1.5	2.25	3.0	g
- N-Propanol	3.0	6.0	9.0	12.0	ml
- Perchlorsäure 60%	1.3	2.6	3.9	5.2	ml

Die Lösung darf erst unmittelbar vor Verwendung und unbedingt unter dem Digestorium hergestellt werden.

Kollagen Standard Stock Lösung in 20ml dH₂O

- Gelatine Hydrolysat 100mg in 20ml dH₂O

Bei 37°C auflösen. Von der Standardlösung werden Aliquots von 250µl in Eppendorf-Röhrchen abgefüllt und bei -20°C tiefgefroren.

Kollagen Standard Kurve

Es wurde jeweils 5µg/µl Kollagen Standard verwendet und gemäss *Tabelle 2* in Eppendorf-Röhrchen pipettiert und kurz zentrifugiert:

TABELLE 2

Nr.	Gelatine µg	Standard Lösung µl
1	0	0
2	10	2
3	20	4
4	30	6
5	40	8
6	50	10
7	75	15
8	100	20
9	150	30

Vorbereitung der Knorpel-Proben:

Die Knorpel Stücke wurden direkt in Eppendorf-Röhrchen gelegt und bei -20°C gefroren. Sie wurden für den Gebrauch des Versuches aufgetaut. Das Gewicht der Proben wurde notiert (jeweils zwischen 4-6mg)

Methode:

Hydrolyse:

Die Eppendorf-Röhrchen wurden beschriftet. Die Chloramine T-Lösung wurde aus dem Kühlschrank genommen und im Wasserbad auf 30°C erwärmt, um allfällige Kristalle aufzulösen. Der Heizblock wurde auf 120°C erwärmt. Die Standards wurden gemäss *Tabelle 2* vorbereitet. Die Standards wurden in Eppendorf-Röhrchen pipettiert und jeweils 100µl NaOH den Standards, wie auch den Proben zugefügt. Die Deckel der Eppendorf-Röhrchen müssen sorgfältig verschlossen und mit einem Clip gesichert werden, andernfalls könnten die Proben explodieren. Dann werden die Proben und Standards für 30 Minuten bei 120°C inkubiert. Aus Sicherheitsgründen werden die Röhrchen noch mit einem Gewicht beschwert, um ein explosionsartiges Öffnen der Röhrchen zu verhindern. Mittels einer Pinzette wurden die Röhrchen vom Heizblock genommen und während 5 Minuten auf Zimmertemperatur abgekühlt. Alle Proben werden vor dem Öffnen in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert, bevor die Reaktion in den Röhrchen mit 100µl 1.4N Zitronensäure gestoppt wird.

Farbreaktion

In die Eppendorf-Röhrchen wurden jeweils 500µl Chloramin T-Lösung zugefügt, gevortext und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zuvor wurde die Chloramin T-Lösung aufgewärmt, um Kristallbildung zu verhindern. Während der Inkubation wurde eine Aldehyde Perchlorsäure-Lösung im Digestorium vorbereitet.

Entwicklung

In die Eppendorf-Röhrchen wurde 500µl der Aldehyd Perchlorsäure-Lösung zugefügt, gevortext und die geschlossenen Deckel wieder sorgfältig mit Clips gesichert und mit einem Gewicht belastet. Für 20 Minuten bei 70°C wurden die Proben auf dem Heizblock erwärmt. Die Proben haben sich dadurch gelb-braun verfärbt. Die Röhrchen wurden danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Versuch wurde in einer 96-Loch Mikrotiter Platte für Elisa Leser dreifach (A/B/C Reihen) durchgeführt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 540nm gemessen. Es wurde 100µl der Standardlösung und Proben in dreifacher Ausführung in die Lochplatten pipettiert. Vor der Messung im Elisa-Platten-Leser wurde sichergestellt, dass sich keine Luftblasen in den Probelösungen befanden. Die Umrechnung der Konzentrationen wurden in Excel gemäss der Standard *Tabelle 2* durchgeführt.

5.1.6 PCR

RNA Isolierung

Die Knorpelproben wurden nach Entnahme in RNAlater (Qiagen) 24 Stunden bei 4° C und dann bei -20° C aufbewahrt. Als Vorbereitung für die mRNA-Isolation wurden ca. 20–30 mg Knorpelproben zerkleinert, mit 1 ml Tri Reagent (Sigma T 9424)¹⁷ versetzt, gekühlt und anschliessend mit einem Polytron Mixer homogenisiert. Nach Zugabe von 200 µl Chlorform, 15 Sekunden vortexen, und einer Zentrifugation von 15 Minuten bei 12'000 G und 4°C, wurde der wässrige Überstand abpipettiert und mit gleichem Volumen 70%igem Ethanol vermischt, bevor es auf eine RNeasy Säule (RNeasy Kit, Qiagen) übertragen wurde. Die weiteren Arbeitsschritte wurden gemäss RNeasy Kit-

Instruktion durchgeführt⁸⁷. Das Auftragen auf die RNeasy Säulen erfolgte in zwei Schritten, da die Säulenkapazität nur 700 µl beträgt. Für die letzte Waschung wurde der Probe 30 µl Wasser zugefügt und ein zweites Mal durch die Säule gelassen, mit dem Ziel, eine höhere Ausbeute zu erhalten. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA bei –80°C aufbewahrt.

Transkription der mRNA in cDNA

Alle Chemikalien stammen, sofern nicht anders vermerkt, von Promega Corp. Catalys AG, CH-Wallisellen. Zu 7,5 µl der gewonnenen RNA wird 2,5 µl einer Reaktionslösung (für eine Probe: 1 µl 10x DNase Puffer, 1 µl DNase, 0,5 µl RNasin) pipettiert, zu welcher nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C 1 µl Stop Lösung beigefügt wird. Die Proben werden weitere 10 Minuten bei 65° C inkubiert. Jeder Probe wird 15,5 µl einer zweiten Reaktionslösung (für eine Probe: 5 µl Magnesium Chloride, 5 µl 5x RT Buffer, 2,5 µl Nucleotide Mix, 0,5 µl RNasin, 1,25 µl AMV RT, 1,25 µl Random Hexamers) dazupipettiert. Nach Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur, 60 Minuten bei 42° C und 5 Minuten bei 95° C werden die Proben 5 Minuten auf Eis gelegt und 20 Sekunden zentrifugiert. Weiter wird jede Probe mit DEPC Wasser auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht.

PCR

Eine quantitative TaqMan RT-PCR (ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems (AP), Perkin Elmer Corporation) wurde wie bereits beschrieben^{116, S. 124} für die nachfolgend aufgeführten Parameter durchgeführt. Es wurde jeweils 5 µl cDNA enthaltendes Probenmaterial mit 20 µl einer Lösung bestehend aus 12,5 µl 2x Mastermix (Eurogenics AG), 0,5 µl Primer (f), 0,5 µl Primer (r), 0,2 µl Sonde und 6,3 µl DEPC-Wasser vermischt. Für jedes zu bestimmende Zytokin wurde die Lösung jeweils mit den Zytokin-spezifischen Primern und Sonden hergestellt (Tabelle 3). Als Negativkontrolle aller DNA-Sequenzen wurde 5 µl DEPC-Wasser gemessen.

Tabelle 3: Primer und Sonden (Microsynth, CH-Balgach)

GAPDH	.74f	AAG TGG ATA TTG TCG CCA TCA AT
	.161r	AAC TTG CCA TGG GTG GAA TC
	.108p	ACC TCA ACT ACA TGG TCT ACA TGT TTC AGT ATG ATT CC
COX2	.98f	TGA GTG TGG GAT TTG ACC AGT ATC
	.238r	GGG TAA GTA TGT AGT GTA CTG TGT TTG GA
	.139p	ACA GGA TTC TAT GGT GAA AAC TGT TCA ACA CCT G
Inos	.279f	GGA TGA CTT TCG AGG ACA TGC
	.388r	GGG CCC TCT GGT CAT ACT TTT
	.310p	AAG CGA CCT CCC CAT TGG CCT
IL-1	.7f	GCA GTA CCC GAC ACC AGT GA
	.88r	TTT TGG GCC ATC CTC CTC A
	.31p	TCA TTC TCA TTG CCG CTG CAG TAA GCT AT
IL-6	.155f	AGC ACA TTA AGT ACA TCC TCG GC
	.305r	CCA GAT TGG AAG CAT CCG TC
	.181p	ATC TCT GCC CTG AAA AAT GAG ATG TGT AAC AAT TT
MMP-1	.986f	AAG CTG CTT ATG AGG TTT CCC A
	.1082r	GGG TAT CCG TAG AGC ACA TCC T
	.1018p	AGC CCA GTA CTT ATT ACC TTT GAA AAA CCG GAC
MMP-2	.42f	CGG CTA CAC ACC TGA TCT GGA
	.270r	GGA GTC TCC CCC AAC ACC A
	.178p	CGC TGG GAG CAC GGA GAT GGG TA
MMP-3	.601f	AAC ACT GGA CGA AGG ATG CAT
	.675r	ACC CAG GGA ATG ACC AAG TTC
	.624p	AGG GAT CAA TTT TCT CCT TGT TGC TGC TCA

f: Forward Primer r: Reverse Primer s: Sonde

Die Quantifizierung der DNA-Expression erfolgt über den C_T-Wert (threshold cycle), bei dem die Reporter-Fluoreszenz erstmals einen Schwellenwert übersteigt. Bestimmt wird dieser Wert so, dass die Kurven aller zu vergleichenden Zytokine in der exponentiellen Phase geschnitten werden⁴⁷. Eine relative Quantifizierung der Zytokine wurde durch Normalisierung der Zytokine anhand equinem GAPDH vorgenommen. Als Kalibrator diente die Probe mit der geringsten Expression (= Faktor 1).

5.1.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Messergebnisse von NO, PGE₂, Kollagen, Kollagenolytische Aktivität, Stromelysin, Proteoglykane (PG) und der PCR (GPDH, iNOS, Cox2, IL-1, IL-6, MMP-1, MMP-3) wurden mit ANOVA von Stat-View, (Abacus Concepts Inc., Berkeley CA), sowie mit SPSS 14.0 for Windows durchgeführt.

5.2 Vorversuch (Evaluation der geeigneten MCS-Konzentration)

Um die geeignete Konzentration für den Hauptversuch zu eruieren wurden folgende Vorversuchsreihen gemacht:

5.2.1 Vorversuch A

Dieser Versuch diente zum Erlernen der Methoden wie, Gewinnung und Ansetzen des Knorpels.

5.2.2 Vorversuch B

Die Proben stammen von einem Pferd, unbekannten Alters, das jedoch altershalber geschlachtet wurde. Die Versuchsreihe wurde nur mit MCS stimuliert (kein LPS). Es wurde je eine 0,002% (C₂) und eine 0,004% (C₄) MCS-Lösung verwendet. Die Proben c und d enthalten weniger Knorpel als die Proben a und b.

Proben-Nr.:

Gruppe	Proben-Nr.	Konzentration	
		C ₂	C ₄
Kontrolle	1a, 1b, 1c, 1d		
MCS		2a, 2b, 2c, 2d	3a, 3b, 3c, 3d

Um einen ersten Anhaltspunkt über den Effekt von MCS zu erhalten, wurde NO und PGE₂ bestimmt. Die Auswertung erfolgte nur qualitativ, d.h. die Gewichte der jeweiligen Proben wurden nicht berücksichtigt.

5.2.3 Vorversuch C

Für das Probenmaterial wurde Knorpel eines 8-jährigen Warmblutpferdes, das wegen Headshaking geschlachtet wurde, entnommen. Die Konzentrationen der MCS-Lösungen betrugen: 0,001% (C₁), 0,005% (C₅), 0,01% (C₁₀) und 0,05% (C₅₀). Die Versuchsreihe gestaltete sich wie folgt:

Proben-Nr.

Gruppe		MCS-18-Konzentration			
		C ₁	C ₅	C ₁₀	C ₅₀
Kontrolle	4a, 4b				
LPS	5a, 5b				
MCS		6a, 6b	7a, 7b	8a, 8b	9a, 9b
LPS + MCS		6c, 6d	7c, 7d	8c, 8d	9c, 9d

Es wurden NO und PGE₂ bestimmt. Das PGE₂ der Proben 5a, 6c, 6d, 8a, 8b, 8c, und 9a wurden mit einer 5-fachen, die der Proben 5b, 7c, 7d, 8d mit einer 10-fachen Verdünnung wiederholt, da die Ausgangskonzentration zu hoch war.

5.2.4 Vorversuch D

Die Proben stammen von einem Warmblutpferd, Alter unbekannt, das wegen Strahlbeinlahmheit geschlachtet wurde. Die Konzentrationen der MCS-Lösungen betrugen: 0,025% (C₂₅), 0,05% (C₅₀), 0,075% (C₇₅) und 0,1% (C₁₀₀). Die Versuchsreihe gestaltete sich wie folgt:

Proben-Nr.

Gruppe		MCS-18 Konzentration			
		C ₂₅	C ₅₀	C ₇₅	C ₁₀₀
Kontrolle	10a, 10b				
LPS	11a, 11b				
MCS		12a, 12b	13a, 13b	14a, 14b	15a, 15b
LPS + MCS		12c, 12d	13c, 13d	14c, 14d	15c, 15d

Es erfolgte eine Bestimmung von NO und PGE₂.

5.3 Hauptversuch

Die insgesamt 48 Proben im Doppel stammten von insgesamt 6 Pferden (5 Warmblutpferde und 1 Freiberger) im Alter von 8 bis 16 Jahren, darunter 3 Wallache, 2 Stuten und 1 Hengst. Gründe, die zur Schlachtung der Pferde führten, waren Kreuzschlag (1), Knieprobleme (1), Strahlbeinlahmheiten (3) sowie unbekannt (1). Die Proben wurden je zur Hälfte mit einer MCS-Konzentrationen von 0,1% (C₁₀₀: 10 mg MCS Trockensubstanz pro 100 ml F12) und 0.05% (C₅₀: 5 mg MCS Trockensubstanz pro 100 ml F12, gefiltert) hergestellt.

Die Stimulation wurde folgendermassen durchgeführt (jeweils im Doppel):

Proben-Nr:

	C50	C100		C50	C100		C50	C100		C50	C100
None	1	5	LPS	2	6	MCS	3	7	LPS + MCS	4	8
	9	13		10	14		11	15		12	16
	17	21		18	22		19	23		20	24
	25	29		26	30		27	31		28	32
	33	37		34	38		35	39		36	40
	41	45		42	46		43	47		44	48

Es wurden folgende Parameter gemessen: Aus dem Medium: NO, PGE₂, Kollagenolytische Aktivität, Kollagen, Stromelysin und Proteoglykane. Aus dem Knorpel: iNOS, Cox2, IL-1, IL-6, MMP-1, MMP-2, MMP-3, GPDH.

5.3.1 Repetition 1

Mit gereinigtem MCS-18 wurden nochmals 40 Proben angesetzt. Die Proben stammten von 5 Pferden (4 Warmblutpferde, 1 Isländer) im Alter von ca. 15 bis 20 Jahren. Das Fesselgelenk von Pferd 2 (Proben 9–16) wies arthrotische Veränderungen auf. Die Stimulation wurde ausschliesslich mit MCS gemacht (je zur Hälfte C₅₀ und zur Hälfte C₁₀₀).

Proben-Nr:

MCS	Pferd				
	1a	2a	3a	4a	5a
Kontrolle	1	9	17	25	33
	2	10	18	26	34
C50	3	11	19	27	35
	4	12	20	28	36
Kontrolle	5	13	21	29	37
	6	14	22	30	38
C100	7	15	23	31	39
	8	16	24	32	40

Es wurden folgende Parameter gemessen: NO, PGE₂, Kollagen, Stromelysin, Proteoglykane.

5.3.2 Repetition 2

Mit nochmals gereinigtem MCS-18 wurden 10 Proben, gewonnen aus dem Fesselgelenk eines 11-jährigen Hannoveraner Wallachs, mit folgenden MCS-Konzentration angesetzt.

Proben-Nr:

Gruppe		Konzentration			
		C ₃₀	C ₆₀	C ₉₀	C ₁₂₀
Kontrolle	1, 2				
MCS		3, 4	5, 6	7, 8	9, 10

Es wurden NO und PGE₂ bestimmt.

6. Resultate

6.1 Vorversuch

6.1.1 Vorversuch A

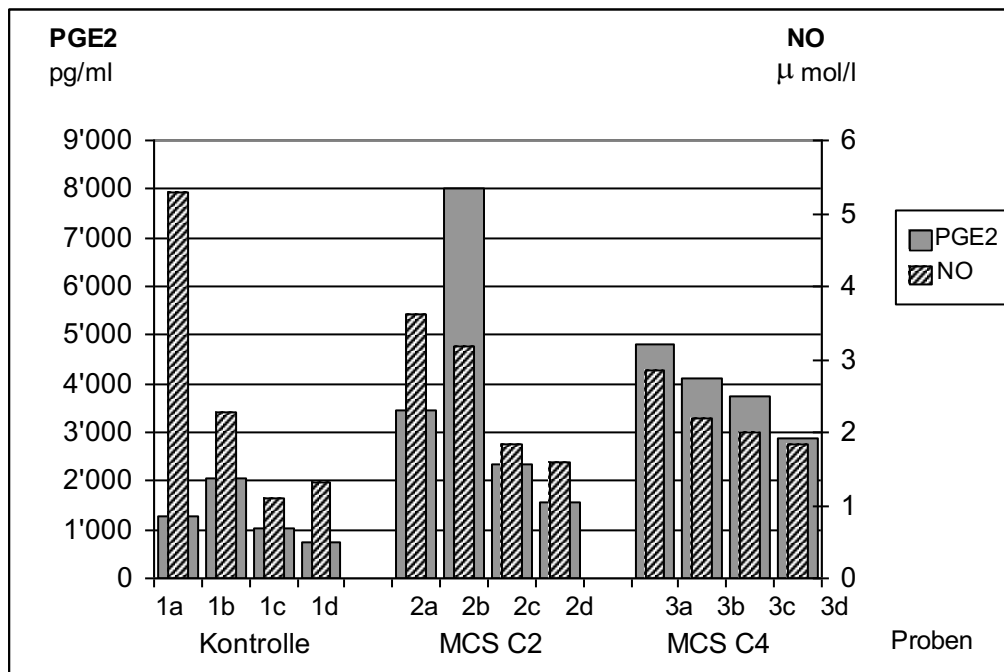
Dieser Vorversuch diente nur zu Übungszwecken, v.a. der Probenentnahmen, und wurde nicht ausgewertet.

6.1.2 Vorversuch B

Die Proben c und d enthielten jeweils weniger Knorpel.

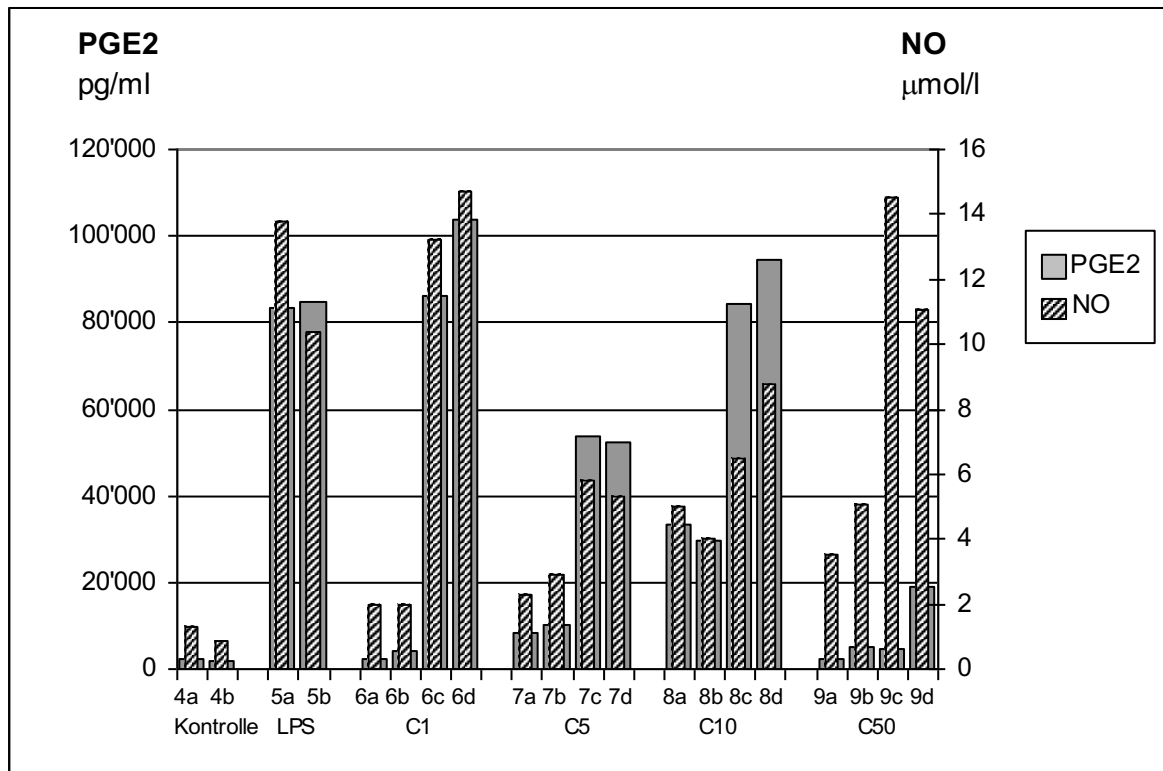
In den mit MCS-stimulierten Gruppen 2 (0.002%) + 3 (0.004%) konnte gegenüber der Kontrollgruppe 1 sowohl eine Erhöhung von NO wie auch PGE₂ festgestellt werden. Die Konzentration von NO und PGE₂ korrelierte zur verwendeten Menge Knorpel (vergleiche Gruppen a und b zu c und d). Die Werte 1a (NO) und 2b (PGE₂) waren sehr hoch und konnten nicht genau quantifiziert werden. In der Gruppe 3, d.h. mit einer höheren MCS Konzentration, konnte insgesamt eine deutliche Erhöhung von PGE₂ im Verhältnis zu NO beobachtet werden.

Abb. 3: NO (Stickstoff) und PGE₂ (a, b, c, d: Bezeichnung der jeweiligen Probe)



6.1.3 Vorversuch C

Abb. 4: NO und PGE₂ Konzentrationen bei MCS-Stimulationen von C1, C5, C10, C50 (a, b, c, d: Bezeichnung der jeweiligen Probe)



NO

Die Kontrollgruppe wies eine niedrige NO-Konzentration auf. Die MCS-Stimulation zeigte bei geringen Konzentrationen (C1 und C5) nur eine geringgradige Erhöhung von NO (C1: x1,8; C5: x2,5). Die MCS-Konzentrationen C10 und C50 erhöhten die NO-Konzentration um 4,3x bzw 4,1x.

Die mit LPS stimulierte Gruppe (5a und 5b) wies eine durchschnittlich 12x höhere Konzentration von NO gegenüber der Kontrollgruppe auf. In den mit MCS+LPS-stimulierten Gruppen (jeweils c und d) waren in C1 und C50 eine ähnlich hohe Konzentration wie in der LPS-Kontrollgruppe zu messen. C5 und C10 wiesen eine ca. halb so grosse Konzentration auf (2,2 bzw. 1,6x niedriger).

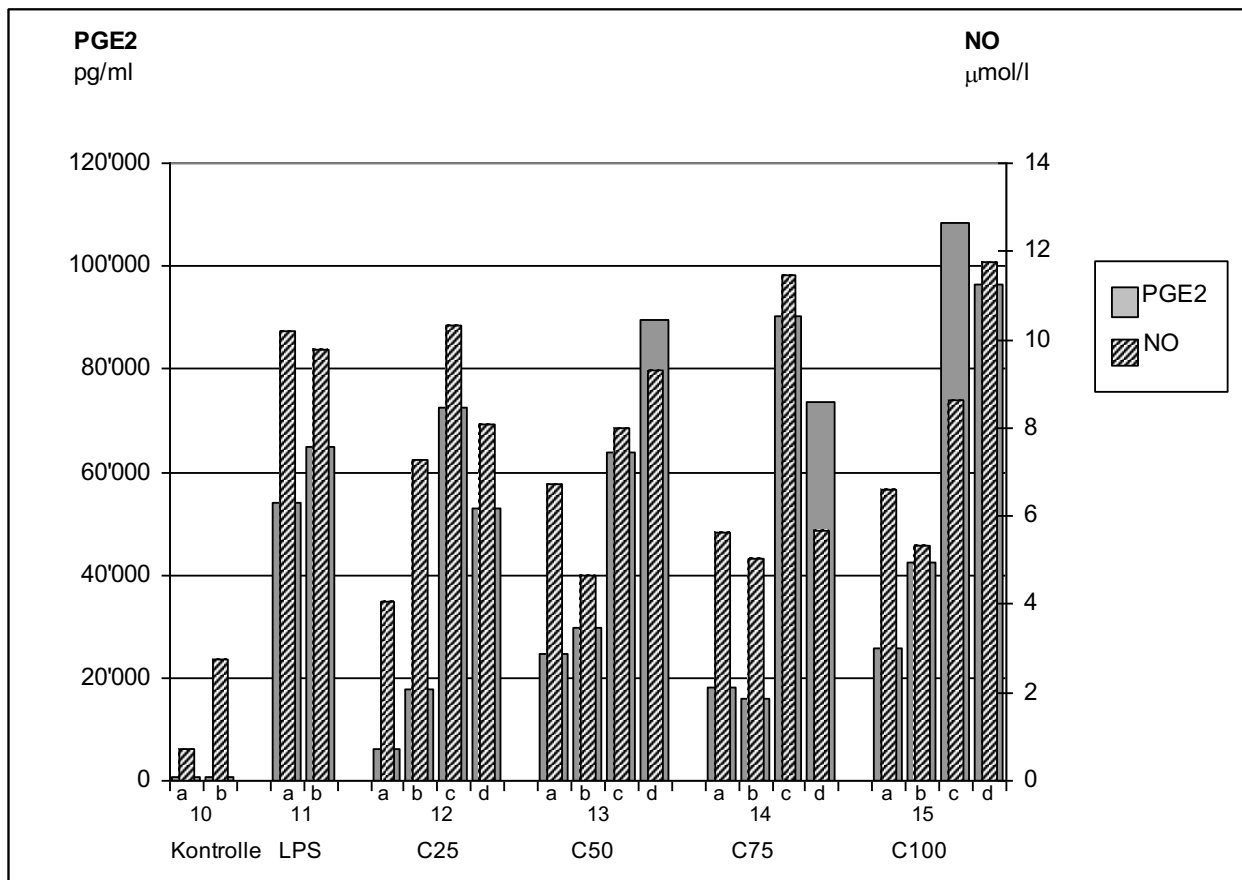
PGE₂

In der Kontrollgruppe, sowie in den MCS-stimulierten Gruppen (a und b) der Konzentration C1, C5 und C50 wurden geringe PGE₂-Konzentrationen gemessen (C1: x1,5; C5: x4,2; C50: x1,7). In C10 war die PGE₂-Konzentration 14,4x höher als in der Kontrollgruppe.

In der LPS-Kontrollgruppe, sowie den mit MCS-LPS-stimulierten Gruppen (c und d) der Konzentrationen C1, C5 und C10 bestanden sehr hohe PGE₂-Konzentrationen. In C50 war PGE₂ deutlich niedriger (durchschnittlich Faktor 7) ausgefallen.

6.1.4 Vorversuch D

Abb. 5: NO und PGE₂ Konzentrationen bei MCS-Stimulationen von C25, C50, C75, C100 (a, b, c, d: Bezeichnung der jeweiligen Probe)

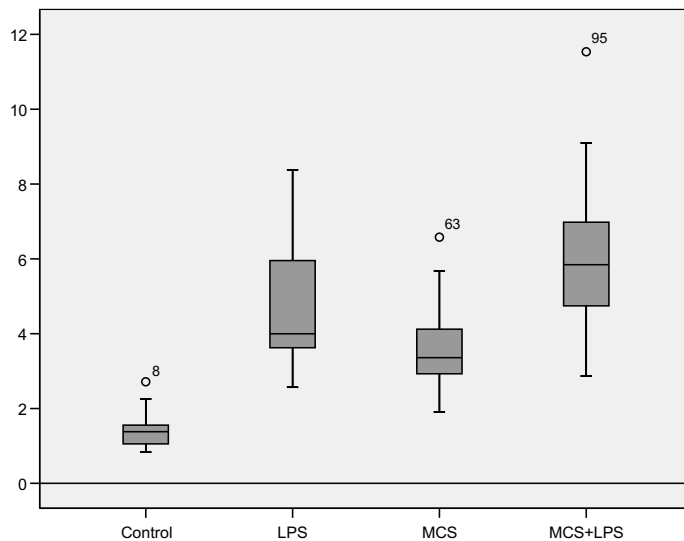


Kontrollgruppe bei C25 um 16x, bei C50 um 35x, bei C75 um 22x und bei C100 um 44x erhöht. Die Mittelwerte aller MCS-LPS-stimulierten (b und c) aller Konzentration sind um Faktor 1 bis 1,7 erhöht.

Im Vorversuch C konnte bei der Gruppe C50 deutlich weniger PGE₂ gemessen werden als bei C1, C5 und C10. Dies konnte beim Vorversuch D nicht bestätigt werden. Für den Hauptversuch wurden die Konzentrationen C50 (0.05% MCS) und C100 (0.1% MCS) verwendet, da aus Vorversuch C eine möglich Down-Regulierung von PGE₂ erwartet wurde.

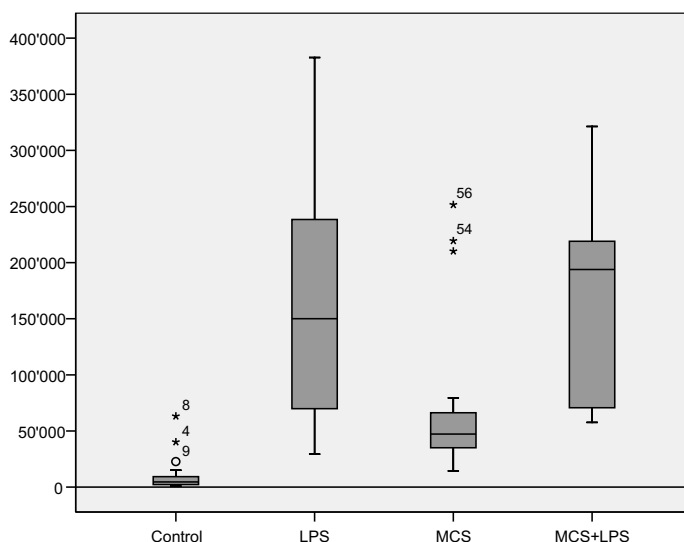
6.2 Hauptversuch

6.2.1 NO ($\mu\text{mol/l}$)



Vergleicht man die NO-Mittelwerte der Kontrollgruppe mit den stimulierten Gruppen, so kann festgestellt werden, dass die NO-Werte der LPS-Gruppe ca. 3,4x, der MCS-Gruppe 2.6x und der MCS-LPS-Gruppe 4.3x höher war.

6.2.2 PGE₂ (pg/ml)



Bei der Kontrollgruppe wurde gegenüber den stimulierten Gruppen eine signifikant geringere PGE₂-Konzentration gemessen. Der Mittelwert der MCS-Gruppe war ca. 9x höher als PGE₂ der Kontrollgruppe. Das gemessene PGE₂ der LPS-Gruppe war 23.5x, das der MCS-LPS-Gruppe 24.2x höher.

Die Altersgruppen der verwendeten Pferde sind wie folgt:

Alter (Jahre)	Proben
<10	1-8, 17-24, 41-48
11-20	9-16, 25-32, 33-40,
>20	keine

Abb. 6: PGE_2 Konzentrationen bei MCS-Stimulationen von C50 unterteilt in die Altersgruppen <10 Jahren und 11-20 Jahre

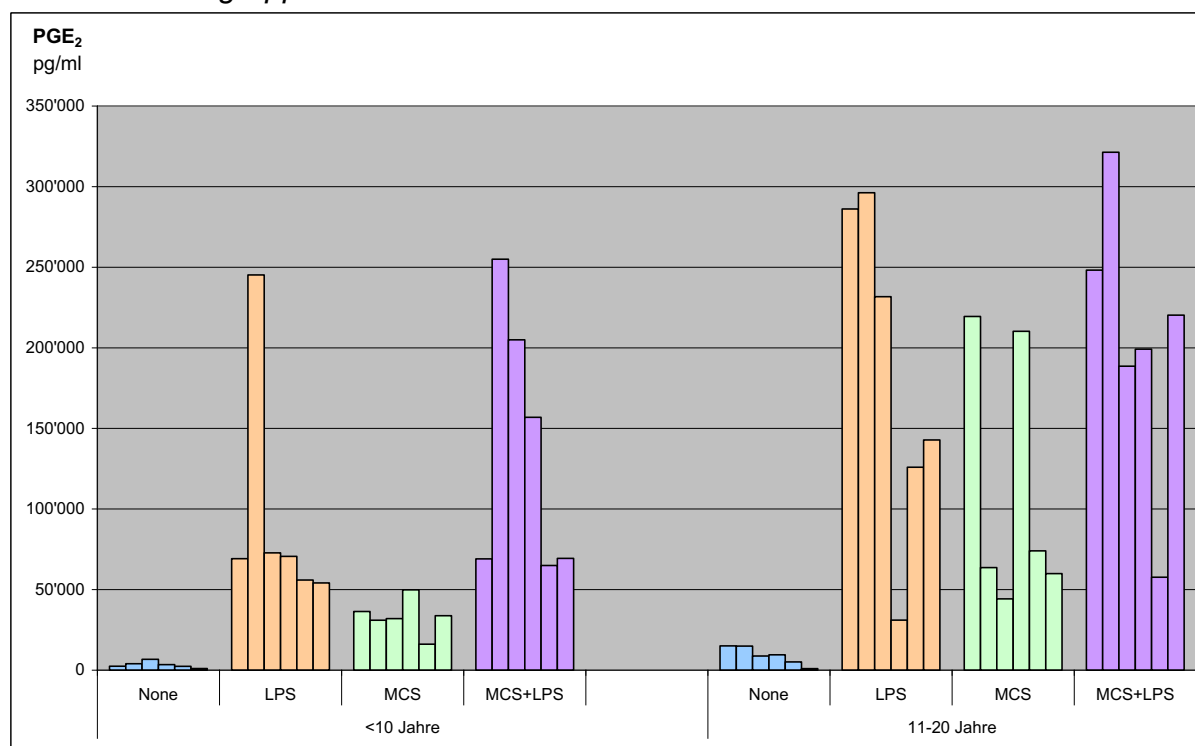
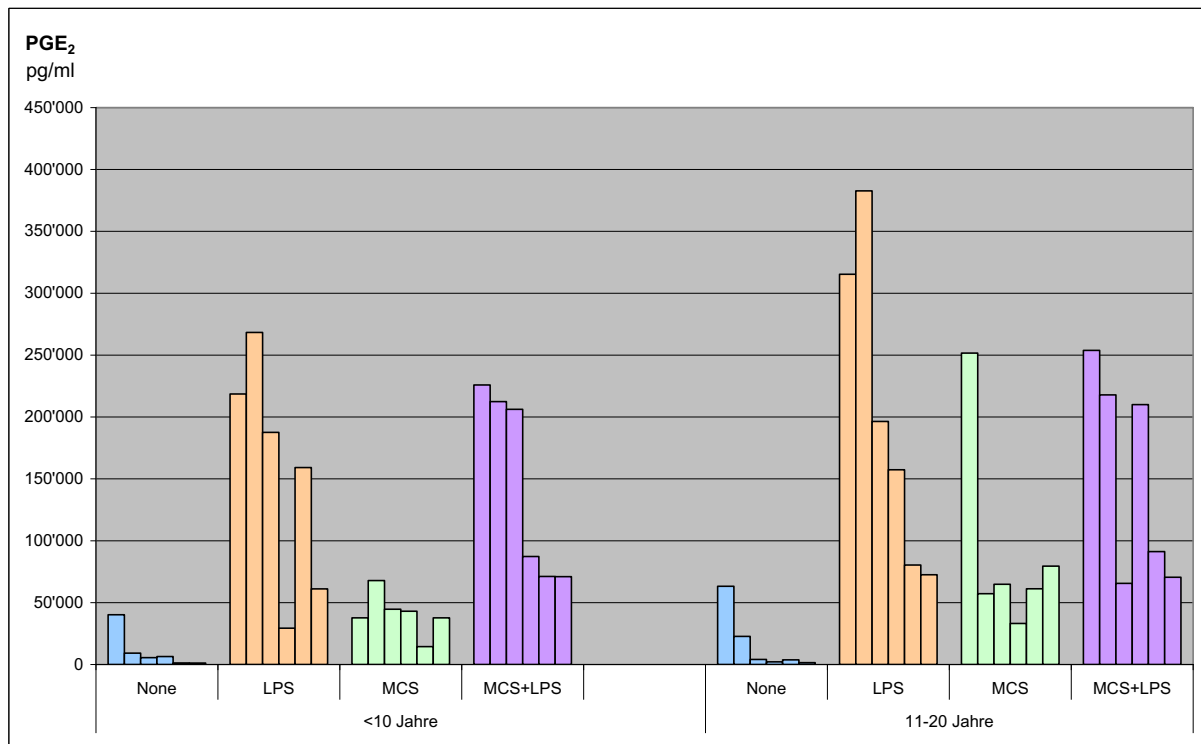


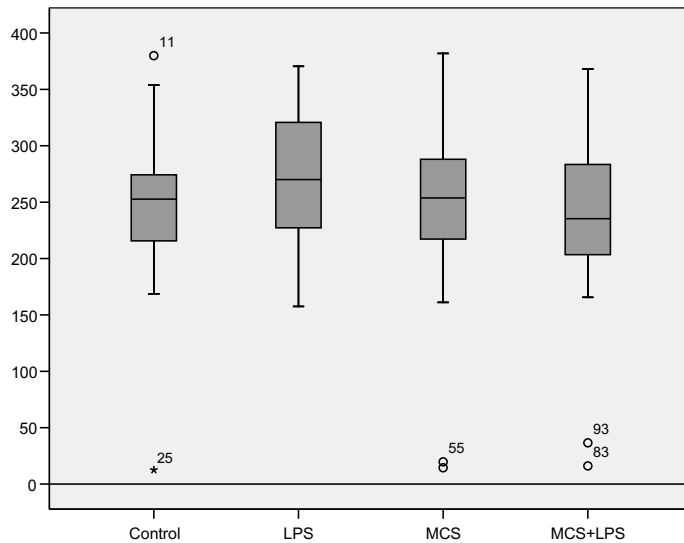
Abb. 7: PGE_2 Konzentrationen bei MCS-Stimulationen von C100 unterteilt in die Altersgruppen <10 Jahren und 11-20 Jahre



Sowohl in der C50 wie auch in der C100 Gruppe zeigte die Altersgruppe der 11-20-jährigen Pferde eine Tendenz zu höheren PGE_2 -Expressionen als in der Altersgruppe der <10-jährigen Pferde.

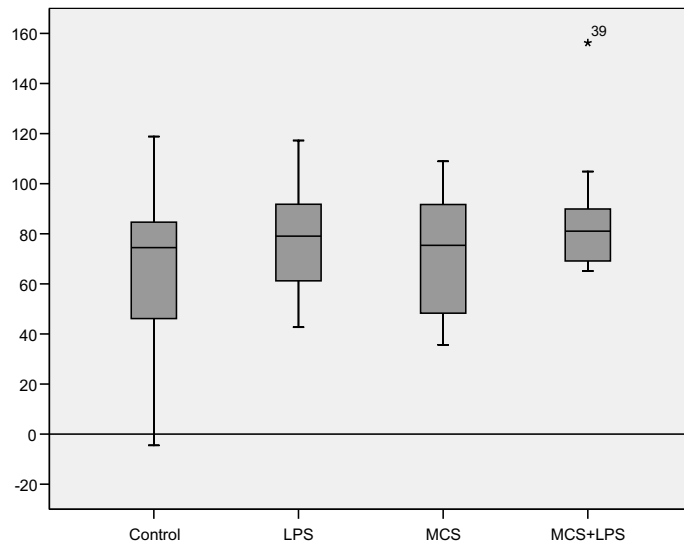
6.2.3 Kollagen und Kollagenolytische Aktivität

Kollagen ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel)



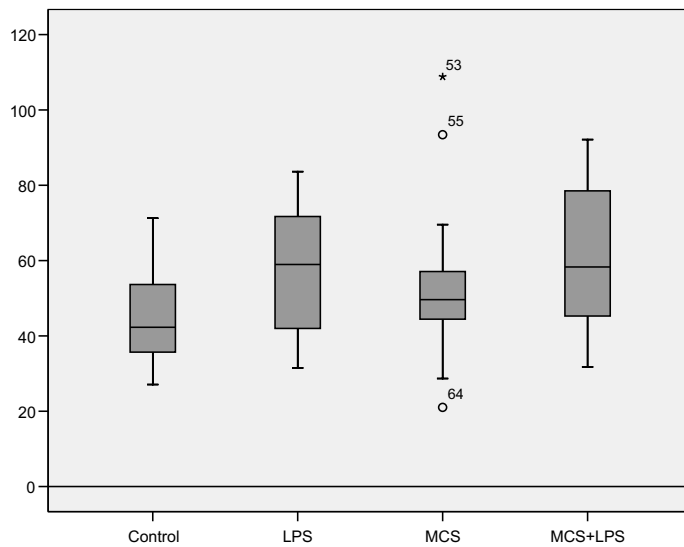
Die Mittelwerte des gemessenen Kollagens war bei der Kontrollgruppe 1,17x höher als bei der MCS-Gruppe und 1,26-1,28x höher als die Gruppen LPS und MCS+LPS.

Kollagenolytische Aktivität (mU/ml)



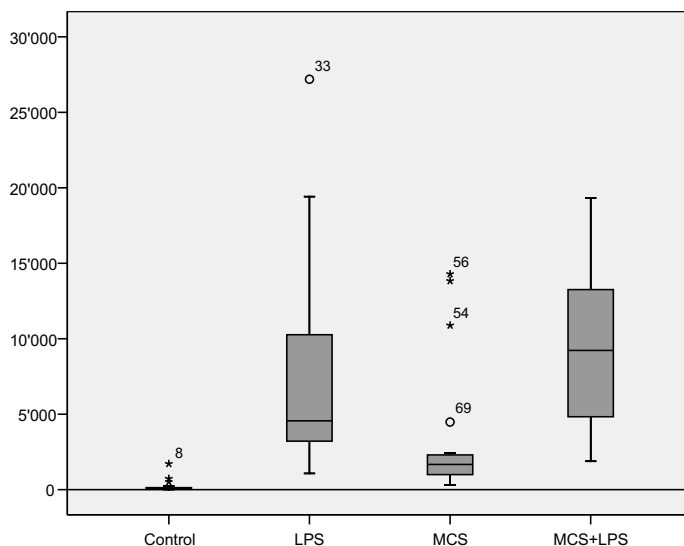
Die doppelten Proben wurden jeweils gepoolt. Die Mittelwerte der Kontrollgruppe waren 1,4 bis 1,6x höher als die der stimulierten Gruppen.

6.2.4 Proteoglykane (PG) (mg/g Knorpel)



Die Mittelwerte der Kontrollgruppe waren 1,4x niedriger als die der Gruppe MCS+LPS. Die der Gruppe LPS 1,1x und die der Gruppe MCS waren 1,2x niedriger als MCS+LPS.

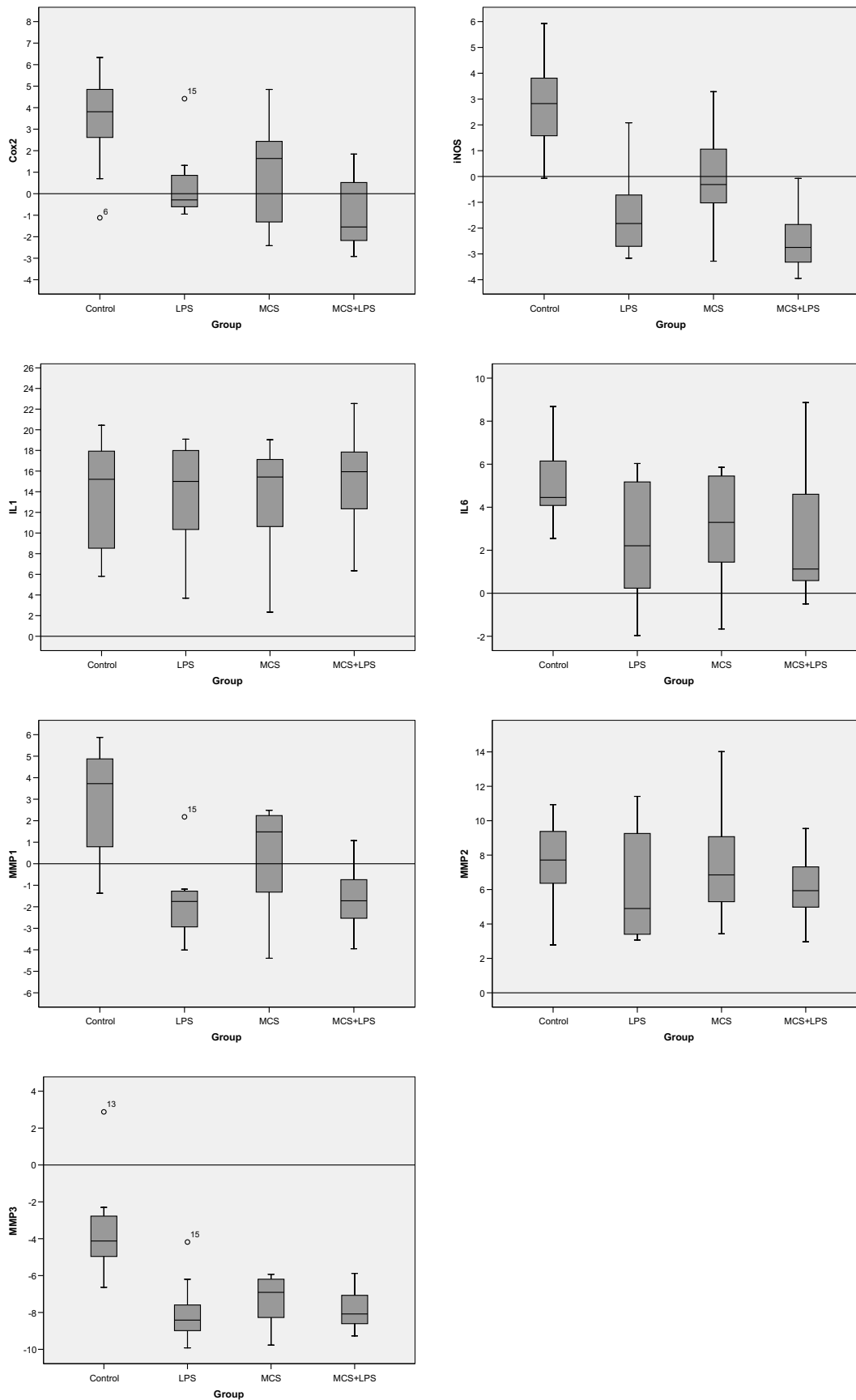
6.2.5 MMP-3 (Stromelysin) (Units/ml)



In der Kontrollgruppe konnten bei den Proben 17a, 29b, 33a+b und 37b keine Stromelysin-Aktivität gemessen werden. Die Mittelwerte der Gruppe LPS waren 2,7x, der Gruppe MCS 1,7x und der Gruppe MCS+LPS 2,9x höher als die Mittelwerte der Kontrollgruppe.

6.2.6 PCR aus Knorpel

C_T



Group	Probe gepoolt	GAPDH	Cox2		iNOS		IL1		IL6		MMP1		MMP2		MMP3	
		C _{T,G}	C _{T,Z}	C _T	C _{T,Z}	C _T	C _{T,Z}	C _T	C _{T,Z}	C _T	C _{T,Z}	C _T	C _{T,Z}	C _T	C _{T,Z}	C _T
1	1	28.05	32.30	4.25	31.47	3.43	45.00	16.96	32.11	4.07	31.71	3.66	37.29	9.25	24.18	-3.87
1	5	25.05	27.59	2.54	26.26	1.21	38.04	12.99	28.56	3.51	29.03	3.98	35.79	10.74	20.09	-4.97
1	9	26.62	27.32	0.70	29.24	2.62	45.00	18.38	32.20	5.58	30.41	3.79	37.56	10.94	23.74	-2.88
1	13	25.45	28.40	2.95	26.21	0.76	31.26	5.81	29.64	4.19	26.09	0.64	33.15	7.70	21.00	-4.45
1	17	27.53	26.41	-1.12	27.46	-0.07	45.00	17.47	30.08	2.55	26.16	-1.37	35.81	8.28	20.90	-6.64
1	21	24.57	29.58	5.01	30.49	5.93	45.00	20.44	28.98	4.41	30.23	5.67	34.08	9.51	22.27	-2.30
1	25	24.30	27.90	3.60	26.77	2.47	32.06	7.76	30.32	6.02	25.24	0.94	27.33	3.03	19.92	-4.38
1	29	28.89	31.58	2.70	32.02	3.14	45.00	16.12	36.93	8.04	33.33	4.45	35.10	6.22	25.88	-3.01
1	33	23.87	30.21	6.34	28.07	4.20	33.18	9.31	28.37	4.50	25.10	1.23	26.66	2.79	18.91	-4.96
1	37	24.86	29.55	4.69	27.90	3.04	32.55	7.69	28.96	4.10	25.11	0.25	31.38	6.52	19.55	-5.32
1	41	24.93	30.54	5.62	26.88	1.95	45.00	20.08	33.61	8.69	30.23	5.31	32.66	7.74	22.26	-2.67
1	45	25.24	29.26	4.02	30.43	5.19	39.54	14.30	31.52	6.28	31.12	5.88	31.91	6.67	28.12	2.88
2	2	26.50	26.92	0.41	23.34	-3.17	45.00	18.50	27.45	0.95	25.15	-1.36	36.04	9.54	17.81	-8.70
2	6	25.92	30.33	4.42	28.00	2.08	45.00	19.09	31.48	5.57	28.10	2.18	37.33	11.42	21.74	-4.18
2	10	28.15	27.43	-0.72	26.07	-2.08	45.00	16.86	28.62	0.47	25.06	-3.09	37.25	9.10	20.42	-7.73
2	14	26.95	28.10	1.15	26.57	-0.38	45.00	18.05	30.42	3.47	25.55	-1.41	36.37	9.42	20.75	-6.20
2	18	27.07	26.57	-0.50	25.04	-2.04	45.00	17.93	25.11	-1.97	25.16	-1.92	32.11	5.04	17.95	-9.13
2	22	34.82	35.38	0.56	35.92	1.10	45.00	10.18	39.61	4.79	33.23	-1.59	41.68	6.86	25.60	-9.23
2	26	27.59	27.22	-0.37	25.98	-1.61	37.40	9.82	33.62	6.03	26.41	-1.18	30.97	3.38	18.74	-8.85
2	30	25.20	26.51	1.32	23.74	-1.46	36.41	11.22	31.17	5.98	23.18	-2.02	28.62	3.43	17.37	-7.83
2	34	26.06	25.35	-0.71	23.33	-2.73	29.75	3.69	26.27	0.21	22.05	-4.01	30.82	4.76	18.61	-7.46
2	38	25.22	24.95	-0.27	22.29	-2.93	35.73	10.51	25.49	0.27	21.53	-3.69	29.47	4.25	16.67	-8.56
2	42	27.13	26.83	-0.30	24.45	-2.68	41.01	13.89	27.12	-0.01	24.35	-2.72	30.20	3.07	17.21	-9.92
2	46	23.63	22.68	-0.95	22.58	-1.05	39.74	16.11	27.19	3.56	22.44	-1.20	26.78	3.15	15.36	-8.28
3	3	27.49	30.10	2.61	28.72	1.24	45.00	17.52	30.13	2.65	29.74	2.26	37.04	9.55	21.39	-6.10
3	7	29.65	30.28	0.63	28.95	-0.70	45.00	15.35	34.86	5.21	31.92	2.27	38.25	8.60	22.79	-6.86
3	11	28.71	26.29	-2.42	25.43	-3.28	31.05	2.34	28.21	-0.49	24.31	-4.40	32.14	3.43	19.44	-9.27
3	15	26.91	25.40	-1.52	25.67	-1.25	45.00	18.09	28.93	2.02	27.18	0.27	36.61	9.70	20.81	-6.10
3	19	28.27	29.88	1.61	27.79	-0.48	45.00	16.73	30.22	1.95	28.85	0.58	35.91	7.64	20.96	-7.32
3	23	30.99	35.83	4.85	34.27	3.29	45.00	14.02	36.40	5.42	32.61	1.62	45.00	14.02	25.06	-5.93
3	27	25.97	24.58	-1.39	25.17	-0.80	45.00	19.04	31.82	5.86	27.31	1.34	31.16	5.20	18.10	-7.87
3	31	24.60	26.36	1.77	25.71	1.12	37.56	12.96	28.54	3.95	26.35	1.76	32.38	7.78	17.95	-6.65
3	35	27.20	29.46	2.26	27.06	-0.15	34.09	6.89	28.15	0.95	24.30	-2.91	33.07	5.87	18.52	-8.68
3	39	29.11	27.87	-1.24	26.53	-2.59	37.41	8.30	27.45	-1.66	25.91	-3.21	32.58	3.47	19.34	-9.77
3	43	24.18	28.13	3.95	25.19	1.01	39.68	15.50	29.96	5.78	26.41	2.23	30.25	6.07	17.89	-6.29
3	47	28.44	30.11	1.67	29.30	0.86	45.00	16.56	33.93	5.49	30.93	2.49	33.84	5.40	21.49	-6.96
4	4	27.45	25.57	-1.88	23.88	-3.57	45.00	17.56	27.39	-0.06	26.58	-0.87	32.72	5.27	18.97	-8.48
4	8	28.63	30.47	1.84	24.69	-3.95	45.00	16.37	29.03	0.40	26.99	-1.65	36.12	7.49	20.00	-8.63
4	12	31.12	29.62	-1.50	28.30	-2.82	45.00	13.89	30.62	-0.49	27.17	-3.95	37.11	5.99	21.92	-9.20
4	16	26.38	23.47	-2.92	23.14	-3.25	45.00	18.62	27.16	0.78	24.02	-2.37	35.93	9.55	18.97	-7.42
4	20	28.82	27.12	-1.71	26.64	-2.18	45.00	16.18	29.71	0.89	26.26	-2.56	34.71	5.89	19.55	-9.27
4	24	29.31	26.70	-2.61	27.77	-1.54	45.00	15.70	30.67	1.37	27.51	-1.80	37.28	7.97	20.72	-8.59
4	28	26.76	25.16	-1.60	23.59	-3.17	37.08	10.32	32.54	5.78	25.22	-1.55	31.19	4.43	18.91	-7.86
4	32	25.75	26.45	0.70	23.27	-2.49	36.56	10.81	34.62	8.87	25.14	-0.61	32.90	7.15	19.03	-6.73
4	36	24.31	23.64	-0.67	21.63	-2.68	30.66	6.35	25.11	0.80	20.73	-3.58	27.28	2.97	16.83	-7.48
4	40	25.46	22.99	-2.47	22.07	-3.39	40.18	14.73	28.89	3.43	22.95	-2.51	32.28	6.82	17.15	-8.31
4	44	22.05	23.22	1.18	21.51	-0.54	40.18	18.13	24.44	2.40	23.12	1.08	26.74	4.69	16.17	-5.88
4	48	22.46	22.80	0.34	22.39	-0.07	45.00	22.54	28.49	6.03	23.47	1.01	28.33	5.87	16.15	-6.32

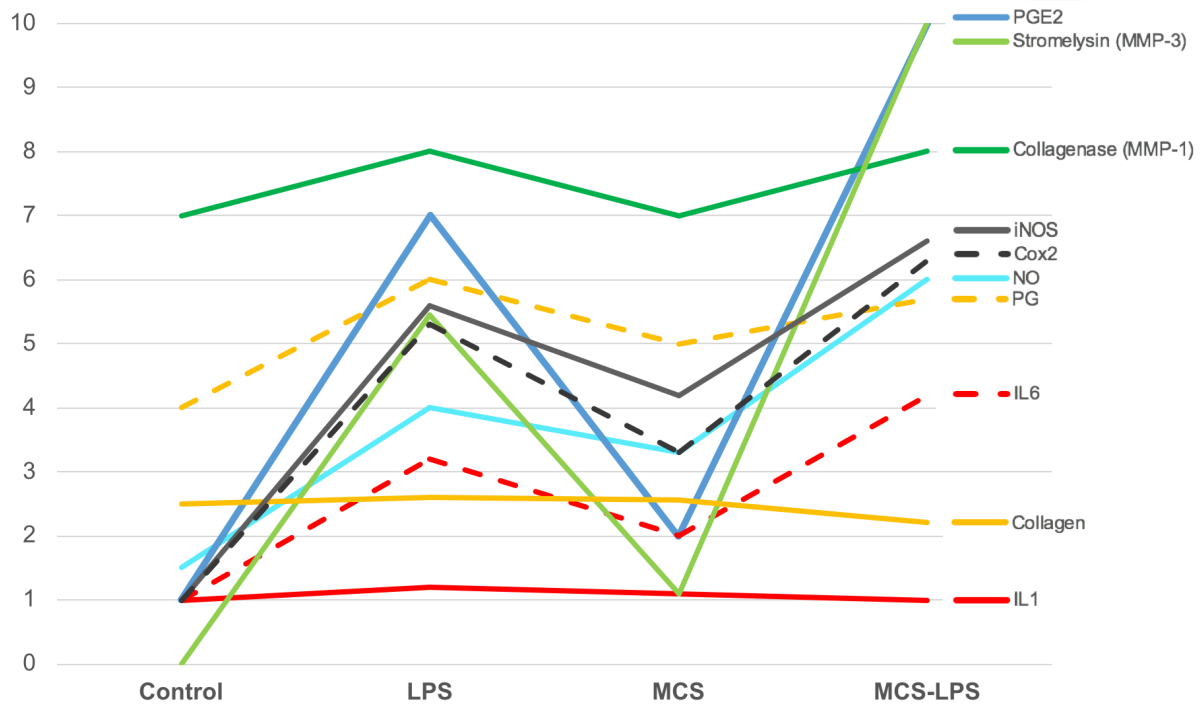
C_{T,G}: Anzahl Zyklen GAPDH

C_{T,Z}: Anzahl Zyklen Zytokin

C_T: C_{T,G} - C_{T,Z}

6.2.7 Übersicht über alle gemessenen Parameter im Hauptversuch

Abb. 8: Vergleich prozentuale Steigung aller gemessenen Parameter

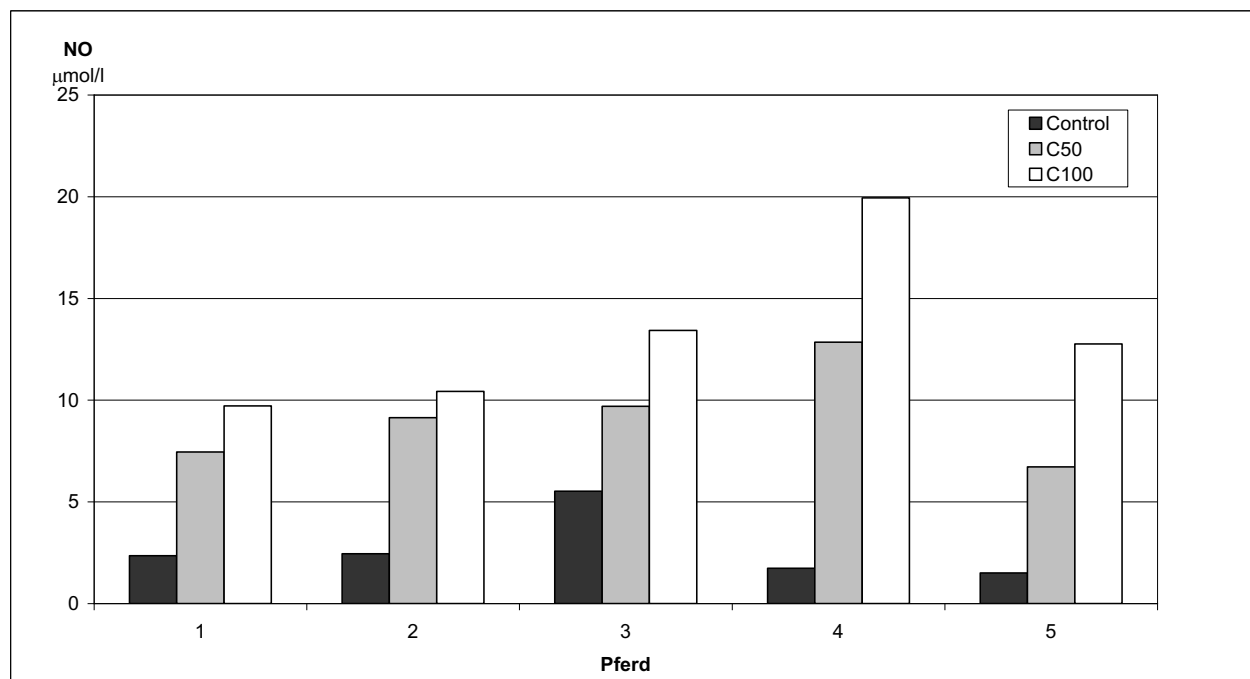
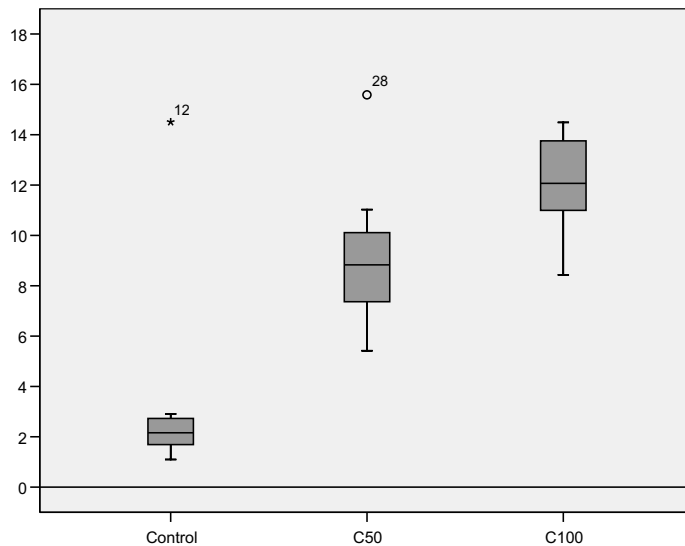


6.3 Repetitionen

6.3.1 Repetition 1

NO

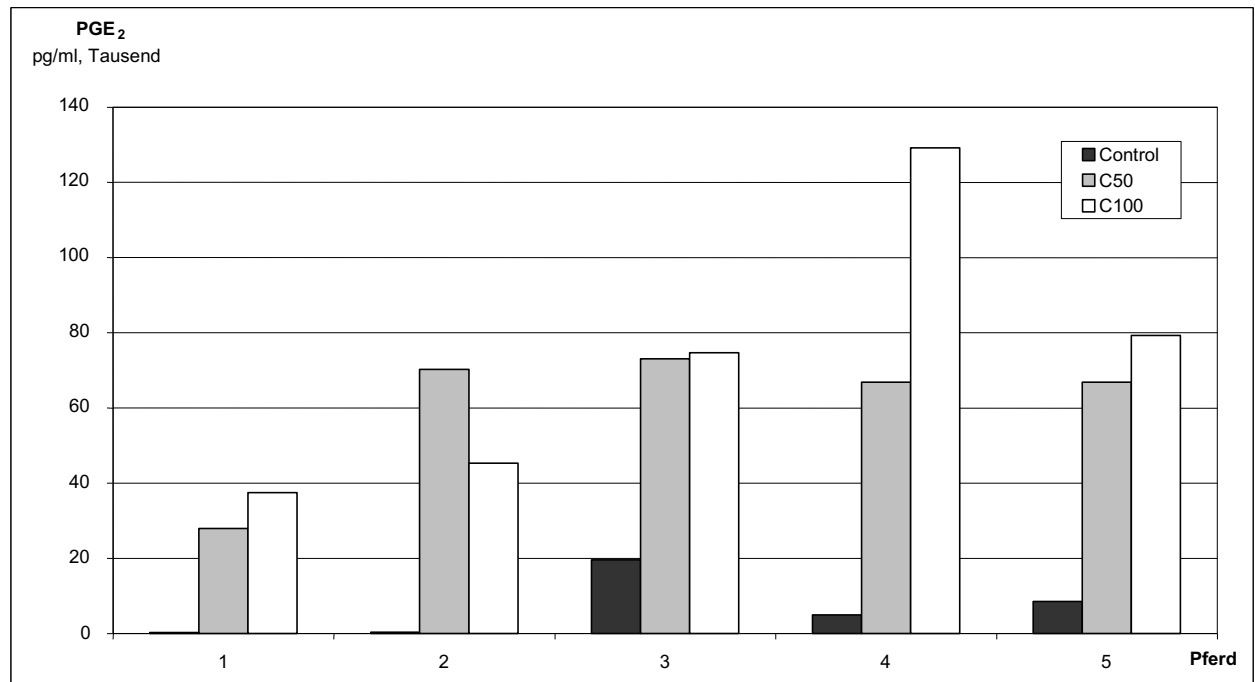
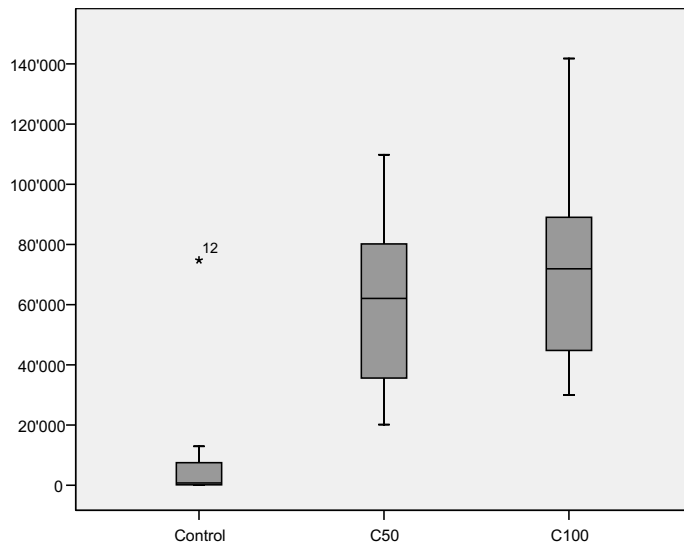
Abb. 9: NO-Konzentration Repetition 1 (Mittelwerte), ($\mu\text{mol/l}$)



In allen Proben bestand eine Korrelation zwischen den Kontrollen und den beiden MCS-Konzentrationen: je höher die MCS-Konzentration, desto höher die NO-Expression. Bei Probe 22 (Pferd 3) wurde eine deutlich höhere (7x) NO-Konzentration als bei den anderen Kontrollen gemessen, was auf einen Fehler zurückgeführt wurde.

PGE₂

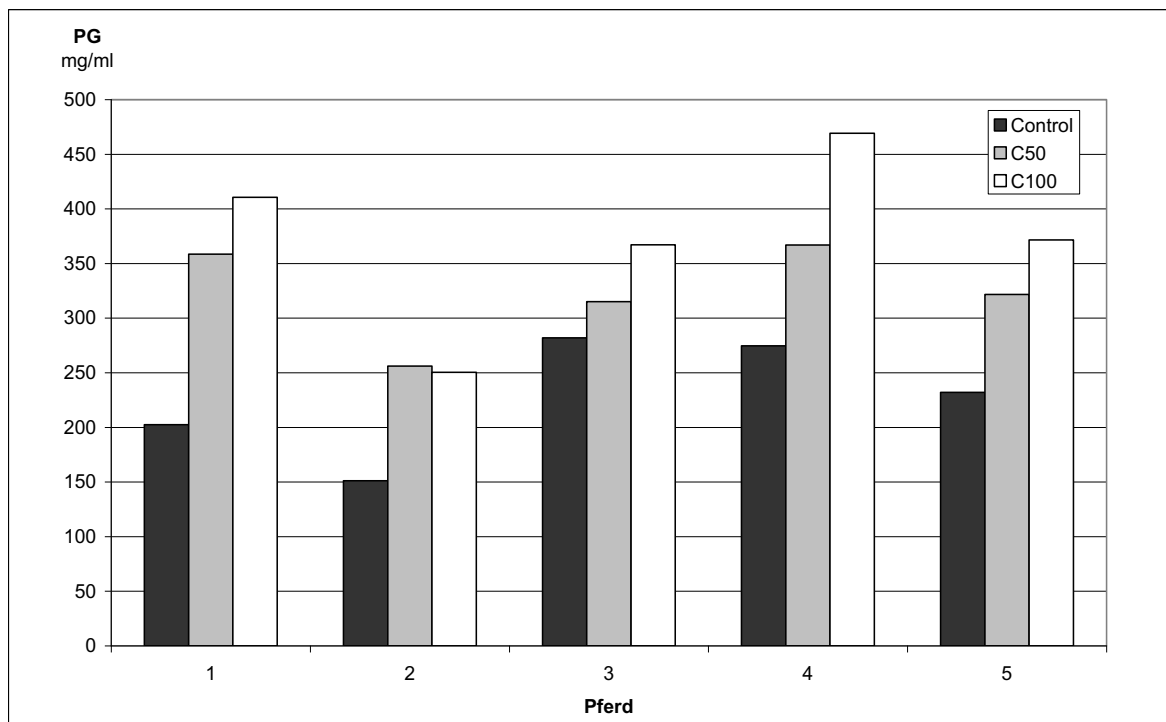
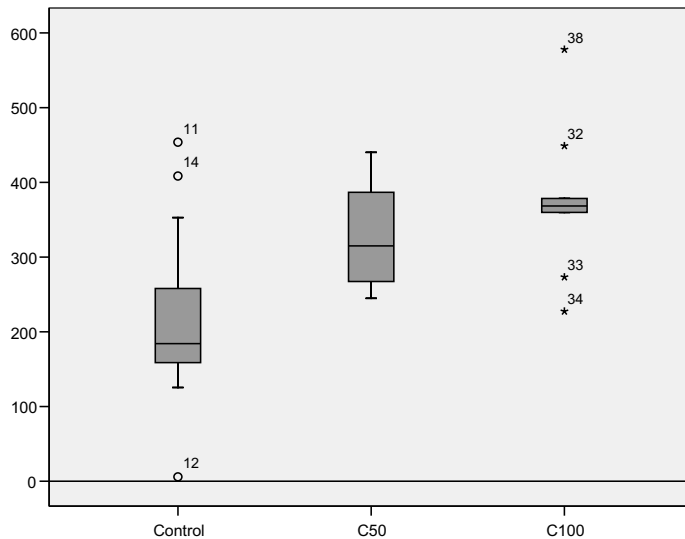
Abb. 10: PGE₂-Konzentration Repetition 1 (Mittelwerte), pg/ml



Ausser bei Pferd 2 (Ausreisser Probe 11), korrelierten die Kontrollgruppen und die beiden MCS-Konzentration wiederum mit der PGE₂-Konzentration. Je höher die MCS-Konzentration, desto mehr PGE₂ wurde exprimiert. C50 und C100 waren signifikant höher als die Kontrollgruppe.

Proteoglykane (PG)

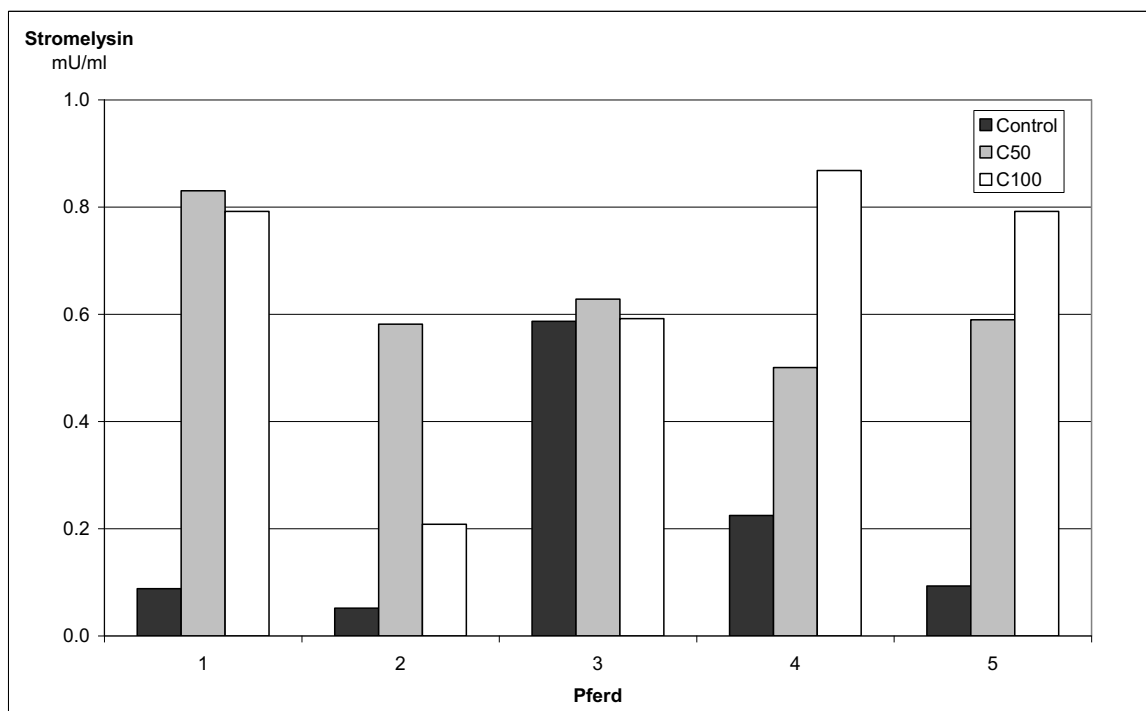
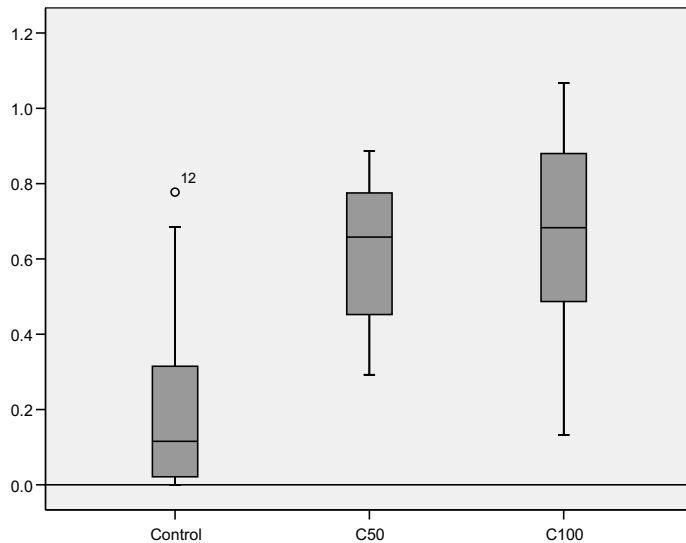
Abb. 11: PG-Konzentration (mg/ml)



Die PG-Expression von C50 und C100 waren bei allen Pferden höher als bei der Kontrollgruppe. Bei allen Pferden, ausser bei Pferd 2, lagen bei der C100-Gruppe höhere PG-Werte vor als bei der C50-Gruppe.

MMP-3 (Stromelysin)

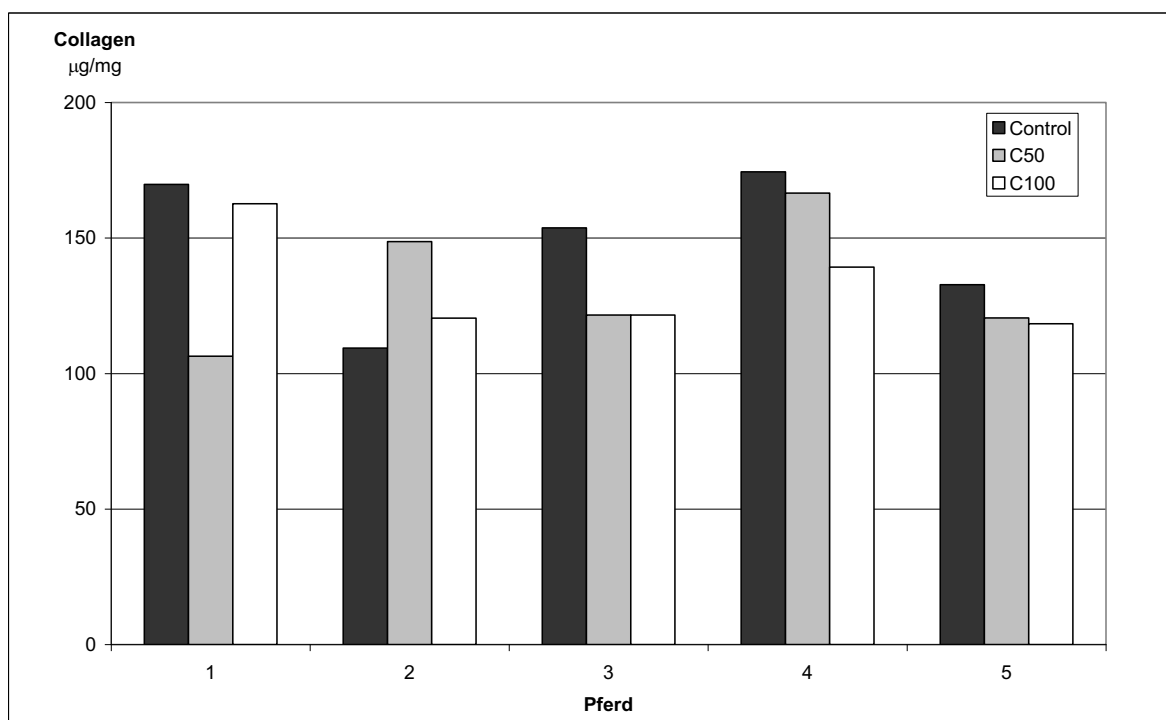
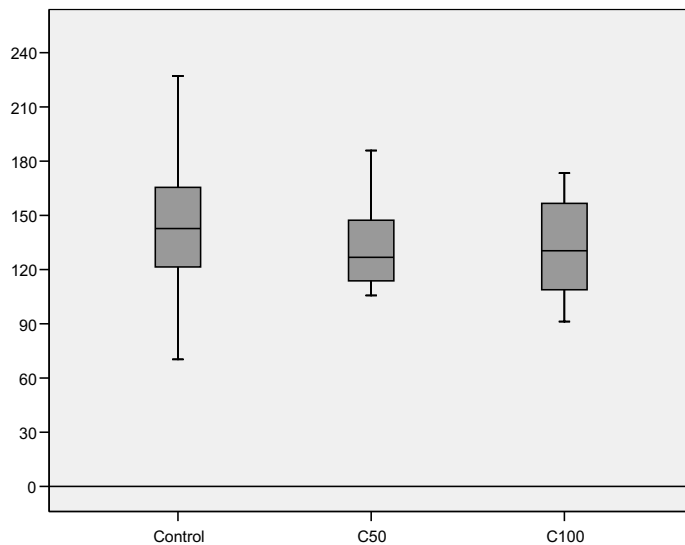
Abb. 12: MMP-3 (Stromelysin)-Konzentration (mU/ml)



Die MMP-3 (Stromelysin)-Expression von C50 und C100 waren bei allen Pferden höher als bei den Kontrollgruppen. Die Kontroll-Gruppe von Pferd 3 war signifikant höher als die Kontroll-Gruppen der anderen Pferde. Die MMP-3-Konzentration der C100 Gruppe war bei den Pferden 4 und 5 höher als die der C50-Gruppe. Bei den Pferden 1 und 3 waren die MMP-3-Konzentration von C50 und C100 etwa gleich gross und bei Pferd 2 war die MMP-3-Konzentration von C50 signifikant höher als bei C100.

Kollagen

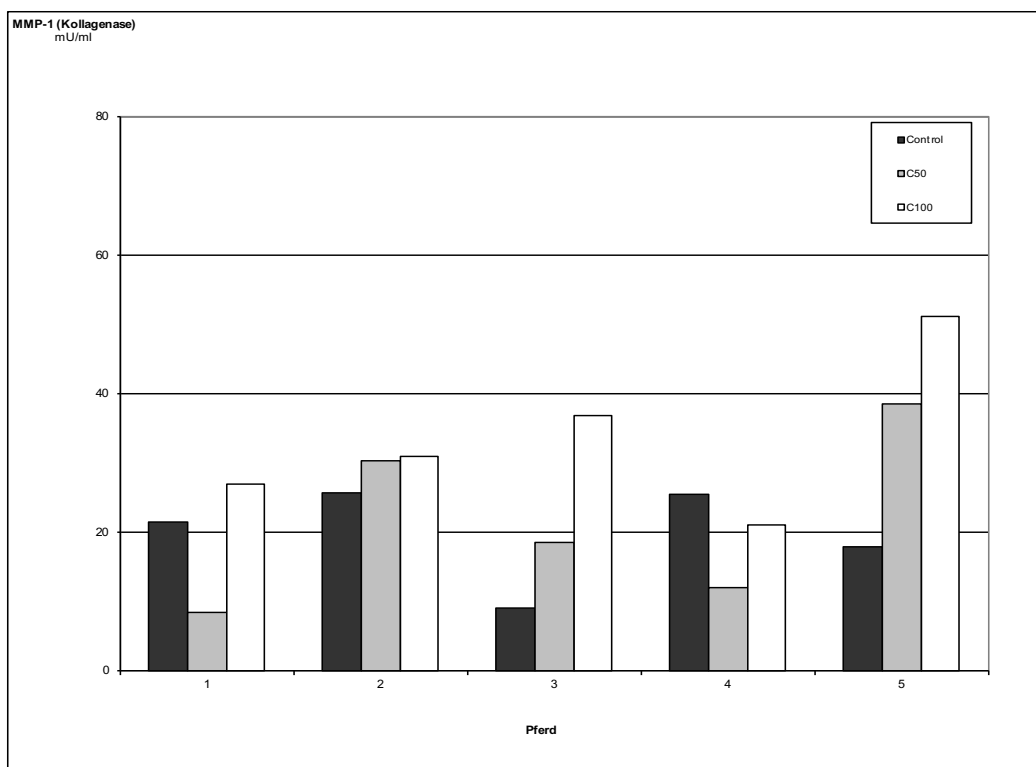
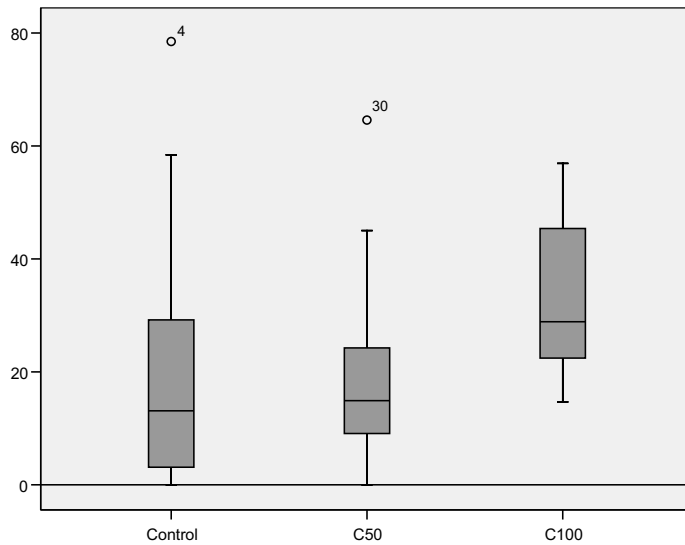
Abb. 13: Kollagen-Konzentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$)



Bei 4 von 5 Pferden war die Kollagen-Konzentrationen der Kontrollgruppen höher als die der MCS-stimulierten Gruppen. Die Pferde 2, 4 und 5 wiesen eine höhere Kollagen-Konzentration von C50 gegenüber C100 auf. Die Kollagen-Konzentrationen waren bei Pferd 3 bei C50 und C100 gleich gross und bei Pferd 1 bei C50 niedriger als bei C100.

MMP-1 (Kollagenase)

Abb. 14: MMP-1 (Kollagenase) (mU/ml)



MMP-1 war bei allen Pferden bei den C100-Gruppen höher als bei den C50-Gruppen. Die Kontrollgruppen wiesen unterschiedliche MMP-1-Werte auf: so lagen sie bei den Pferden 1 und 4 jeweils über den Werten von C50, resp. C100. Bei den Pferden 2, 3 und 5 waren die MMP-1-Werte jeweils niedriger als die C50- und C100-Gruppen.

6.3.2 Repetition 2

Abb. 15: NO-Konzentration in Repetition 2 ($\mu\text{mol/l}$)

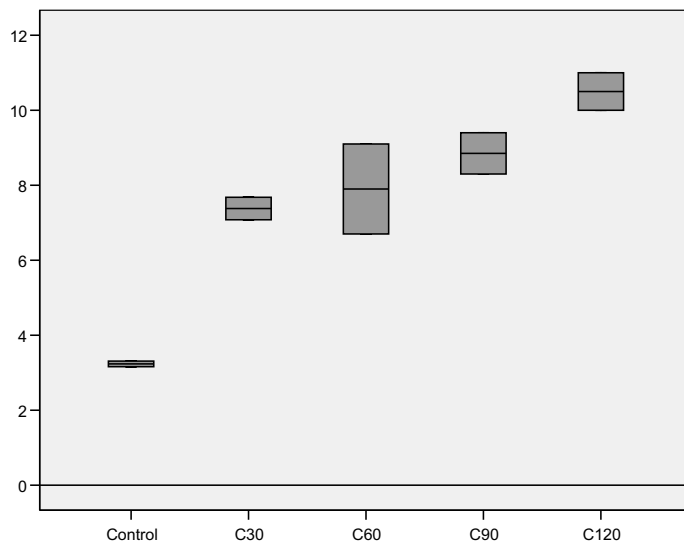
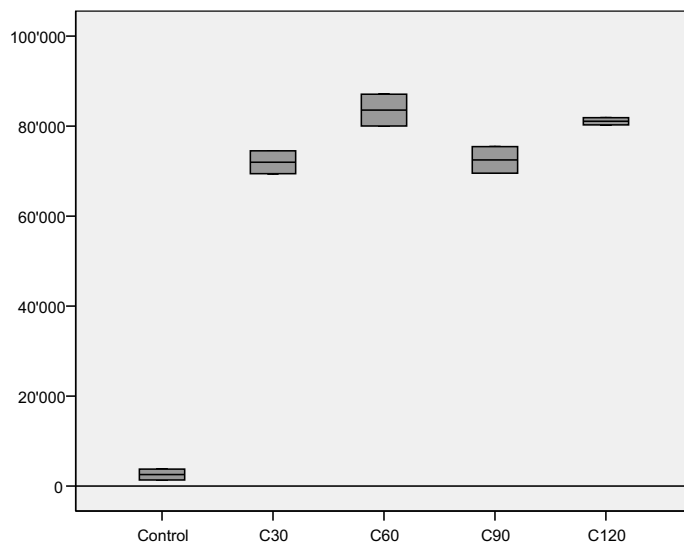
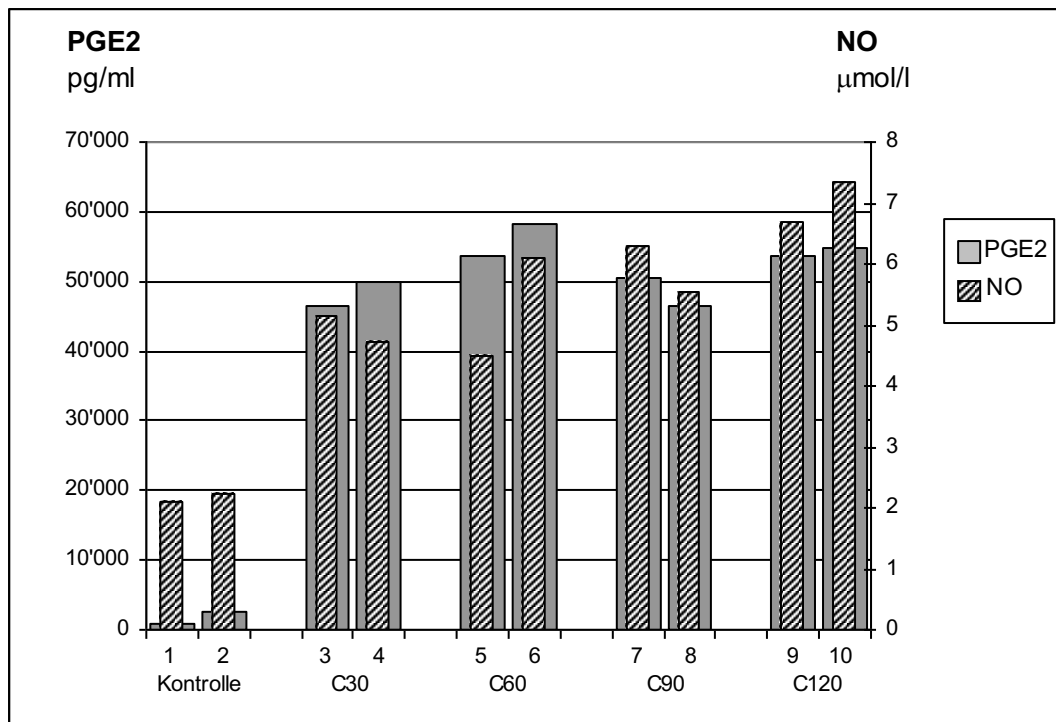


Abb. 16: PGE₂-Konzentration in Repetition 2 (pg/ml)





NO

Die NO-Mittelwerte der Kontrollgruppe waren jeweils um Faktor 2.3 (C30), 2.4 (C60), 2.7 (C90) bzw. 3.2 (C120) mal niedriger als die MCS-stimulierten Gruppen. Es konnte eine Korrelation zwischen NO und der MCS-Konzentration festgestellt werden: je höher die Konzentration, desto mehr NO wurde exprimiert.

PGE₂

Die Konzentration von der PGE₂-Kontrollgruppe war ca. 30x niedriger als die mit MCS-stimulierte Gruppe. Es bestand keine offensichtliche Korrelation zwischen der MCS-Konzentration und der PGE₂-Expression.

7. Diskussion

7.1 Allgemeines

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die in der Volksmedizin seit Jahrhunderten bekannte Wirksamkeit der Balkanrose (*Helleborus purpurascens*) biochemisch zu erklären. Wie Bogdan et. al. 1990 in einer Studie zeigte, konnte bei transdermaler Applikation von *Helleborus*-Extrakt bei Pferden, Rindern, Schafen und Schweinen eine Leukozytose, Neutrophilie und Phagozytose nachgewiesen werden⁸. Der genaue Wirkstoff, sowie der Wirkmechanismus blieb jedoch unbekannt.

2000 gelang es Kerek ein Extrakt (MCS-18) aus *Helleborus purpurascens* Wurzeln zu gewinnen, welcher die Enzymaktivität Na^+/K^+ -ATPase hemmt⁵². Die Na^+/K^+ -ATPase kontrolliert viele wichtige Zellfunktionen, z.B. Ionen-Homöostase, Membranpotential der meisten eukaryotischen Zellen, intrazellulärer pH, Zellvolumen und freie Ca-Konzentration. Dadurch werden viele physiologische Prozesse gesteuert, z.B. Muskelkontraktionen, neuronale Signalleitung, Natrium-Retention in der Niere, Blutdruck u.a. Ausser von MCS-18 wird die Na^+/K^+ -ATPase auch von Glykosiden pflanzlicher Herkunft, z.B. Ouabain oder Digoxin spezifisch gehemmt³⁴.

Knorpel des Pferdes scheint als Probenmaterial geeignet zu sein. Erstens, weil Knorpelopathologien bei Pferden häufig anzutreffen sind^{73, 104, 111} und hier der Einsatz von möglichen neuen Medikamenten auch aus Tierschutzgründen sinnvoll ist und zweitens ist die Probengewinnung einfach, da die Gelenke gross genug sind, um genügend Probenmaterial zu gewinnen und equiner Knorpel dicker ist, als z.B. bei Hunden, Ziegen und Mini-Pigs. Zudem sind Reparatur und Regeneration von chondralen und osteochondralen Defekten bei Pferden in Grösse und Volumen mit menschlichen Knorpelläsionen vergleichbar¹⁸.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von equinen Chondrozyten und der Bestimmung von Entzündungsmediatoren und Zytokinen in-vitro eine mögliche Erklärung für den entzündungshemmenden Effekt⁶³ von Makrozyklischem Suboxid (MCS-18) aus *Helleborus purpurascens* gesucht.

7.2 Methoden

Die hier verwendeten Methoden sind etabliert und in der Literatur vielfach beschrieben^{15, 29, 64, 100, 115, 117}.

7.3 Vorversuch

In einem Vorversuch wurde die effizienteste MCS-Konzentration evaluiert. Dabei wurden als Parameter ausschliesslich die beiden proinflammatorischen Substanzen NO und PGE_2 gemessen^{114, 117}.

In einem ersten Vorversuch (Vorversuch B) wurden die Knorpelkulturen mit MCS-18-Konzentrationen von 0,002% (C₂) und 0,004% (C₄) stimuliert. Bei der Kontrollgruppe 1a konnte eine extrem hohe NO-Konzentration gemessen werden, was evtl. auf „gestresste“ Chondrozyten⁴³ oder auch auf eine Verunreinigung zurückzuführen wäre. Bei den anderen Proben wiesen die MCS-stimulierten Gruppen nur gering höhere NO-Werte auf als bei der Kontrolle, jedoch deutlich höhere PGE₂ Werte, was auf eine Aktivierung der Cyclooxygenase³⁸ schliessen lässt. Die Ergebnisse waren jedoch noch nicht genügend signifikant, so dass in einem weiteren Vorversuch (Vorversuch C) die Konzentrationen 0.001%, 0.005%, 0.01% und 0.05% getestet wurden. Zusätzlich wurde auch eine LPS-Kontrolle mitgeführt. Bei dieser Testreihe blieben NO- und PGE₂ Werte der Kontrollgruppe deutlich unter allen LPS- und MCS-stimulierten Gruppen. Die nur mit MCS stimulierte Proben wiesen gegenüber den MCS-LPS-Gruppen deutlich geringere NO und PGE₂-Werte auf. Es konnte jedoch in Bezug auf die Höhe der Konzentration keine Aussage über die Wirkung von MCS gemacht werden. Bei der 0.05% Gruppe konnte in allen Proben nur wenig PGE₂ nachgewiesen werden. Hierbei könnte es sich um eine tatsächliche Down-Regulierung von PGE₂ oder aber auch um einen Messfehler handeln.

In einem dritten Vorversuch (Vorversuch D) wurden die MCS-Konzentrationen 0.025%, 0.050%, 0.075% und 0.1% getestet. In der Kontrollgruppe konnte wenig NO und kein PGE₂ gemessen werden. In der LPS-Kontrolle waren beide Parameter erhöht. Bei den mit MCS-18 stimulierten Gruppen waren auch beide Parameter erhöht, tendenziell wurde mit zunehmender MCS-Konzentration höhere PGE₂-Werte als bei der LPS-Kontrolle gemessen. Die Werte verhielten sich wie im zweiten Vorversuch (Vorversuch C). Tendenziell wurden bei höheren MCS-Konzentrationen (v.a. in der MCS-LPS-Gruppe) höhere PGE₂ Werte exprimiert. Für den Hauptversuch wurden die Konzentrationen 0.05% und 0.1% gewählt, da aus Vorversuch C eine Down-Regulierung von PGE₂ bei einer Konzentration von 0.05% möglich wäre.

7.4 Hauptversuch

Im Hauptversuch wurde Knorpel aus dem Fesselgelenk von 6 verschiedenen Pferden (spätestens 6 Stunden nach Schlachtung) entnommen und als Zellkultur in 4 verschiedene Gruppen angesetzt: Kontrolle (nur mit Nährmedium), Lipopolysaccharid, (LPS), Makrozyklisches Suboxid (MCS-18) 0.1% und 0.05%, sowie MCS + LPS. Im Hauptversuch wurden die Parameter NO, PGE₂, Kollagen, kollagenolytische Aktivität, Proteoglykane und Stromelysin gemessen. Weiter wurden GLDH, Cox2, iNOS, IL1, IL-6 und MMP-1 und MMP-3 aus den Knorpelstücken mittels PCR bestimmt.

Trotz erhöhten Konzentrationen von Entzündungsmediatoren durch die Stimulation von MCS, konnte keine Herunterregulierung derselben in der zusätzlich mit LPS stimulierten Gruppe festgestellt werden, somit kann der antiinflammatorische Effekt von *Helleborus purpurascens*, bzw. MCS-18 nicht auf eine Down-Regulierung von PGE₂ zurückgeführt werden.

Von allen 6 Pferden wurden jeweils eine Knorpelprobe HE-gefärbt und histologisch bewertet. Dabei konnte bei allen Pferden keine Knorpelschäden festgestellt werden. Zwischen den verwendeten MCS-Konzentrationen von 0.05% und 0.1% konnte kein

signifikanter Unterschied festgestellt werden. Zu den folgenden Diskussionspunkten vergleiche auch Abbildung 8.

7.4.1 Lokale Entzündungsmediatoren (NO und PGE₂)

NO und PGE₂ gehören zu den wichtigsten lokalen Mediatoren, die den Knorpel-Metabolismus beeinflussen²⁹. Ihre Rolle bei der Zerstörung von Knorpel in Folge von rheumatischer Arthritis wurde in den letzten Jahren intensiv bei Mensch und Tier erforscht^{1, 15, 20, 79, 83, 91, 95, 99, 100, 110, 117}. Eine Aufregulierung von NO, PGE₂ und ihren Enzymen stellt ein erster Abwehrmechanismus der Chondrozyten gegenüber toxischen Agenzien dar. Dies wurde früher in vielen Studien und so auch in dieser durch Stimulation mit LPS gezeigt^{33, 64, 70}. Die breit abgestützte Literatur und die Tatsache, dass lokale Entzündungsmediatoren sehr schnell wirksam und experimentell stimulierbar sind, machten sie zu einer geeigneten Methode, den Wirkmechanismus von MCS-18 zu erklären.

Im Hauptversuch konnte gegenüber der LPS-Gruppe, in der mit MCS stimulierten Gruppe nur eine minim geringere Konzentration von NO gemessen werden. In der MCS-LPS-Gruppe war die NO-Konzentration jedoch viel höher als in der LPS-Gruppe. Ob dies nun einem grösseren Toxinstimulus der Chondrozyten durch MCS, einer exogenen Verunreinigung und/oder der NO-protectiven Funktion¹¹⁷ zuzuschreiben ist, lässt sich hier nicht klären. Dazu würden evtl. mehrere Tage andauernde Stimulationen, welche einen Hinweis auf den zeitlichen Verlauf der Mediatoren-Expression geben würde, weiterhelfen. Von Rechenberg zeigte in ihrer Studie über 4 Tage, dass die spontane Produktion (ohne Stimulation) von NO am Tag 2 sinkt, um dann am Tag 3 wieder anzusteigen. PGE₂ steigt vom 1.-3. Tag kontinuierlich an¹¹⁷. In der in-vivo Studie von de Grauw²³ wurde die höchste PGE₂-Konzentration 8 Stunden nach Injektion von LPS gemessen. Hypothetisch könnten die hier gemessenen PGE₂-Werte zum Zeitpunkt der Messung (nach 24 Stunden) schon wieder abgesunken sein. Wobei anzunehmen ist, dass die Chondrozyten durch die Entnahme und Verbringung in Nährmedium „gestresst“ waren und dadurch anfangs eine veränderte Mediatoren-Expression zeigten, so dass ein Vergleich nicht unbedingt möglich ist.

Wie diverse Studien zeigen, kann sowohl NO, wie auch PGE₂ experimentell durch LPS^{23, 64} und durch IL-1³¹ stimuliert werden. Eine Stimulation von NO, iNOs und PGE₂ wurde in diesem Versuch durch LPS bestätigt.

Feelisch stellt eine rein entzündungsfördernde Wirkung von NO in Frage und vermutet, dass die Funktionsweise von NO wahrscheinlich viel komplexer ist³². Dies würde bedeuten, dass eine entzündungshemmende Wirkung nicht mit der alleinigen Hemmung von NO erklärt werden könnte.

PGE₂ wird durch die Stimulation von LPS massiv erhöht. Dabei liegen die Werte von der MCS+LPS-Gruppe fast gleich hoch, wie die mit LPS-stimulierte Gruppe allein. Ein Zusatz von MCS (zu LPS) vermag also die PGE₂-Synthese nicht zu hemmen. Die PGE₂ Konzentration im Medium und die Cox-2 Genexpression verlaufen in etwa gleich, was mit den bereits beschriebenen Theorien übereinstimmt³⁸.

Bemerkenswert wird in einer finnischen Studie mit Rattenknorpel zwar die Stimulation von NO und PGE₂ durch IL-1 bestätigt, jedoch eine gegenseitige Beeinflussung von NO und PGE₂ dementiert. Die verwendeten NO-Inhibitoren N-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) und L-N-Iminoethyl-Ornithin (L-NIO) bauten zwar NO ab, hatten jedoch keinen Einfluss auf die PGE₂-Produktion. Exogenes NO hatte auch keinen Einfluss auf die Produktion von PGE₂. Acetylsalicylsäure reduzierte die PGE₂-Expression und hatte einen geringgradig hemmenden Einfluss auf die NO-Expression. Dexamethason hemmte die IL-1 induzierte PGE₂-Expression, jedoch nicht die NO-Expression⁴⁹. Wo hingegen Freen et. al. beobachtet, dass Dexamethason (ein iNOS Inhibitor) eine LPS-stimulierte NO-Expressionen sehr wohl zu hemmen vermag³³. Aber auch der genaue Wirkmechanismus von Glukokortikoiden ist nicht bekannt und bleibt Bestandteil weiterer Forschung²².

Wirkstoffe, welche die NO Synthese (insbesondere die iNOS)⁷⁹, IL-1 und/oder NO und PGE₂⁴⁹ hemmen, sind nützliche therapeutische Mittel, um Knorpeldegenerationen zu verhindern. Ein NO-hemmender Effekt durch MCS-18 konnte im Gegensatz zu anderen Studien⁶³ in unserem Versuch innert 24 Stunden nicht nachgewiesen werden.

Malik et. al. hat in seiner Studie einen antiinflammatorischen Effekt von *H. purpurascens* beschrieben, indem sie eine inhibitorische Wirkung auf COX-1 und COX-2, (Vorstufen von PGE₂) feststellten⁶⁶. Wir konnten in dieser Studie keinen inhibitorischen Effekt auf PGE₂ feststellen. Diese Erkenntnisse erhärten die Vermutung, dass MCS-18 keinen direkten Einfluss auf die NO und PGE₂-Sekretion hat und bei direkter Stimulierung höchstens als proinflammatorische Substanz erkannt wird.

Einen Trend zur altersabhängigen PGE₂-Expression wie Briston¹⁰ sie aufzeigte konnten wir in unserem Hauptversuch bestätigen. So zeigte die Altersgruppe der 11-20-jährigen Pferde eine Tendenz zu höheren PGE₂-Expressionen gegenüber der Altersgruppe <10 Jahre.

7.4.2 Zytokine (IL-1 und IL-6)

Die IL-1 Messungen zeigen kaum Unterschiede zwischen den getesteten Gruppen. Man kann also die erhöhten Werte der anderen Zytokine und lokalen Entzündungsfaktoren zumindest in den Knorpelproben nicht auf eine Aufregulation durch IL-1 zurückführen.

In osteoarthritischen Knorpelzellen wird vermehrt IL-1 exprimiert, was eine Stimulation von NO und PGE₂ zur Folge hat, bei der eine Aufrechterhaltung eines katabolen Zustandes zu einer Knorpelzerstörung führt¹. Die Ausschüttung von iNOS und NO während einer Gelenksentzündung/-infektion erfolgt durch Chondrozyten und Synovialzellen⁷⁹. Hier wäre wiederum interessant zu wissen, ob zu einem früheren Zeitpunkt eine IL-1 Expression nachzuweisen wäre. Jedoch sind im gesunden Gelenkknorpel jeweils nur sehr geringe Konzentrationen von IL-1 zu finden, während bei OA minim höhere Konzentrationen und bei rheumatoiden Arthritiden stark erhöhte IL-1 Konzentrationen vorliegen.

Fan et. al haben in ihrer Studie herausgefunden, dass bei einer Osteoarthritis Chondrozyten auf einen externen Stimulus von IL-1 der Synovia mit einer katabolen Signalkaskade reagieren³⁰. IL-1 bei RA-Patienten wird v.a. von Makrophagen der Synovia gebildet. Auch Sutton et. al. bestätigt dies und empfiehlt künftige Therapieansätze zum Schutz vor Knorpelabbau vor allem auf die Synovia zu fokussieren¹⁰⁴. Durch die fehlende Synovia in der vorliegenden in-vivo Studie wäre die fast konstante IL-1 Konzentration in allen Gruppen in vorliegender Studie zu erklären.

Die IL-6-Konzentrationen in der vorliegenden Studie weisen wiederum denselben Verlauf auf, wie die lokalen Entzündungsmediatoren: Die MCS-Gruppe ist gegenüber der Kontroll-Gruppe erhöht, die Werte in der LPS-Gruppe sind noch höher und die der MCS-LPS-Gruppe übersteigen sogar die von der LPS-Gruppe. Eine Stimulation von IL-6 durch IL-1 liegt hier nicht vor, eine Stimulation durch PGE₂ ist wahrscheinlich⁷². Auch von IL-6 wird eine protektive Wirkung vermutet, was zumindest in den vorliegenden Resultaten die Abkoppelung von der IL-1 mRNA Regulierung erklären würde.

Da Zytokine auch redundant funktionieren können (z.B. IL-1 und TNF) kann die Ausschaltung eines Zytokins in der Therapie möglicherweise noch keine ausreichende Wirkung verursachen, da deren Funktionen durch andere Zytokine übernommen werden⁶¹.

Die Beobachtung einer Hemmung von IL-6 von Dietel⁸, konnte in dieser Studie nicht aufgezeigt werden.

7.4.3 Metalloproteinase (MMPs)

Neben NO und PGE₂ spielen auch Metalloproteinasen (Kollagenasen, Gelatinasen und Stromelysin) eine wichtige Rolle bei der Homöostase sowie beim Untergang von Knorpelgewebe^{71, 72, 117}.

De Grauw²⁴ hat in seiner Untersuchung von Meloxicam in-vivo in Synovia PGE₂ und MMP-3 gemessen. Während die PGE₂-Konzentration 8 Stunden nach LPS-Injektion am höchsten war, um dann nach 24 Stunden wieder fast auf Level 0 abzufallen, zeigte die MMP-Aktivität einen langsameren Abfall. So war die MMP-Aktivität nach 24 Stunden immer noch etwa gleich hoch wie nach 8 Stunden, nach 7 Tagen immer noch etwa 1,5-2x so hoch, wie die Kontrolle.

In der vorliegenden Studie wurden die Proben 24 Stunden inkubiert, PGE₂ und MMP zeigen einen zeitlich simultanen Verlauf, jedoch weist die LPS-MCS Gruppe eine deutlich höhere MMP-Aktivität auf, als die LPS-Gruppe. Die MCS Gruppe hat etwa die gleiche MMP-Aktivität, wie die Kontrollgruppe.

7.4.4 Matrixproteine (Proteoglykan, Kollagen)

Proteoglykane (PG) werden bei einer Schädigung des Knorpels initial hochreguliert, um danach unter den Grenzwert abzufallen⁹⁵. In unserem Versuch konnten in allen stimulierten Gruppen erhöhte PG-Werte gemessen werden. PGs werden v.a. durch

Stromelysin (MMP3) abgebaut. In der MCS-Gruppe waren die Werte nur minim geringer als in der LPS und in der MCS-LPS Gruppe. Die PG-Werte korrelieren mit den gemessenen Stromelysin-Werten. Interessant wäre auch hier sicherlich eine Verlaufsmessung über mehrere Tage.

Kollagen wird durch Kollagenase (MMP-1), ein lysosomales Enzym, abgebaut. In der vorliegenden Studie, konnte zwar eine kollagenolytische Aktivität in den stimulierten Gruppen festgestellt werden (siehe auch Abbildung 8), die Kollagenwerte unterscheiden sich jedoch kaum in allen Gruppen. Dies könnte auf die kurze Stimulationsdauer zurückzuführen sein.

7.4.5 GADPH

GADPH (Glutaraldehydphosphatdehydrogenase) wurde als Kontrolle („Housekeeping mRNA“) verwendet, da dieses Enzym von allen Zellen gleichbleibend exprimiert wird⁵⁹. Bei Kontaminationen oder zu wenig GADPH in der Ausgangsprobe, steigt ihre Produktion nur langsam oder gar nicht an und die Proben sind nicht auswertbar. So werden alle gemessenen mRNA Mengen auf den Wert von GADPH in derselben Probe bezogen.

7.5 Repetitionen

Da die Vermutung aufgekommen ist, dass das in den vorangegangenen Versuchen verwendete MCS evtl. Verunreinigungen aufgewiesen hat, wurden nochmals zwei Repetitionen mit verbessert gereinigtem MCS⁵³ durchgeführt. In einer ersten Testreihe (Repetition 1) wurden nochmals 40 Proben angesetzt, die ausschliesslich mit MCS stimuliert wurden (je zur Hälfte mit 0.05% und 0.1% MCS-Konzentrationen). Bei den Proben von Pferd Nr. 2 (Proben 9–16) konnten makroskopisch arthrotische Veränderungen festgestellt werden, was sich jedoch nicht auf die Ausschüttung von NO und PGE₂ auswirkte. Wiederum bestätigten sich die allein durch MCS hervorgerufenen stark erhöhten NO und PGE₂ Werte. Im Gegensatz zur PGE₂-Messung, wo die Unterschiede nicht so deutlich sind, konnte bei der NO-Messung eine deutliche Erhöhung der 0.1% MCS-Gruppe gegenüber der 0.05% MCS-Gruppe gezeigt werden. In einer zweiten Repetitions-Reihe mit nochmals gereinigtem MCS wurden nochmals 10 Proben angesetzt mit den Konzentrationen 0.03%, 0.06%, 0.09% und 0.12%. Es zeigte sich wiederum eine mit der Höhe der MCS-Konzentration korrelierenden NO-Exprimierung. Dies war bei der PGE₂ Messung nicht so deutlich, die Werte waren jedoch gegenüber der Kontrollgruppe alle signifikant höher.

7.6 Schlussfolgerung

Die in dieser Studie gemessenen Resultate können einen entzündungshemmenden Effekt von MCS-18 mit direktem Einfluss auf die Entzündungsmediatoren und Zytokine nicht bestätigen. Sie lassen eher vermuten, dass MCS-18 durch eine NO- und PGE₂-Stimulation eine Knorpeldegeneration fördert, zumindest in-vitro.

7.7 Ausblick

Eine Aufregulierung von Zytokinen und lokalen Mediatoren über einen Zeitraum von 24 Stunden, wie sie in dieser Studie gezeigt wurde, gibt sicherlich keinen allumfassenden Überblick über die komplexen Mechanismen und Abläufe der Zellreparation, bzw. -degeneration und die mittlerweile bekannten viel komplexeren Signalwege der Entzündungsmediatoren⁶. Dazu wären Stimulationen über mehrere Stunden oder Tage mit mehreren Bestimmungen der Abbauprodukte zu verschiedenen Zeitpunkten sinnvoll. Ob die Zytokine-Aufregulierung durch MCS-18 wirklich eine Knorpeldegradierung zur Folge hat, müsste in weiteren Studien, evtl. mit einer chronologischen Verlaufskontrolle bestätigt werden.

Obwohl jetziger Stand der Wissenschaft ist, dass proinflammatorische Zytokine den Knorpelabbau stimulieren und deren Hemmung den Knorpel schützen kann, stellt sich die Frage, ob nun MCS-18 als „toxisches Agens“ wirkt und eine Aufregulierung von Entzündungsmediatoren evtl. auch einen Heilungsverlauf bei chronischen Erkrankungen einleiten könnte⁸. Ob erhöhte Entzündungsmediatoren, wie z.B. NO, chondroprotektiv oder eher chondrodestruktiv wirken bleibt aufgrund der Komplexität des Zusammenspiels der Entzündungsmediatoren und Zytokine, Gegenstand weiterer Studien³².

Die am plausibelste Erklärung der Wirkung von MCS-18 zeichnet sich bis jetzt am ehesten über den immunsuppressiven Einfluss auf dendritische Zellen (DC)/T-Zellen^{26, 48, 57, 94} oder die Bildung von Antikörpern⁵⁴, welche auch schon in-vivo beobachtet wurden. Ein weiterer Ansatz ist die Funktion von MCS-18 als Antagonist des Capsaicin-Rezeptors^{54, 81}. Letzteres würde jedoch eine reine Schmerzbekämpfung darstellen und würde die Ursachen einer Osteoarthritis nicht beheben.

Die in dieser Studie experimentelle Stimulation mit LPS simuliert eine infektiös bedingte Entzündung, jedoch kommen bei Pferden meist traumatisch bedingte Osteoarthritiden vor^{73, 98} und so müsste weiter untersucht werden, ob sich Wirkstoffe wie MCS-18 oder Helleborus purpurascens auch in-vivo bei an OA erkrankten Pferden bewähren. Da beim Pferd rheumatoide Arthritiden kaum vorkommen, bzw. bisher nicht beschrieben wurden^{72, 73}, ist der Einsatz von MCS-18 beim Pferd fraglich, sofern sich eine ausschliesslich immunsuppressive Wirkung bestätigt.

Als weitere Frage stellt sich, ob MCS-18 allein oder mit weiteren Substanzen (z.B. Fettsäuren, v.a. α -Linolensäure) aus Helleborus purpurascens-Wurzeln einen entzündungshemmenden Effekt bewirken, wie Malik et. al. Helleborus purpurascens-Wurzelextrakt als COX/LOX-Hemmer beschreibt⁶⁶.

8. Literaturverzeichnis

- 1 ABRAMSON, S. B., ATTUR, M., AMIN, A. R. AND CLANCY, R.; Nitric Oxide and Inflammatory Mediators in the Perpetuation of Osteoarthritis; 2001; Curr Rheumatol Rep, 3; 535-41
- 2 ALBULESCU, P. D. R.; Mcs-18: Pharmakologisch-Toxikologische Studien; 2003;
- 3 AREND, W. P., MALYAK, M., GUTHRIDGE, C. J. AND GABAY, C.; Interleukin-1 Receptor Antagonist: Role in Biology; 1998; Annu Rev Immunol, 16; 27-55
- 4 BAICI, A., COHEN, G., FEHR, K. AND BÖNI, A.; A Handy Assay for Collagenase Using Reconstituted Fluorescein-Labeled Collagen Fibrils; 1980; Analytical Biochemistry, 108; 230-232
- 5 BENTON, H. P., MACDONALD, M. H. AND TESCH, A. M.; Effects of Adenosine on Bacterial Lipopolysaccharide- and Interleukin 1-Induced Nitric Oxide Release from Equine Articular Chondrocytes; 2002; Am J Vet Res, 63; 204-10
- 6 BERENBAUM, F.; Osteoarthritis as an Inflammatory Disease (Osteoarthritis Is Not Osteoarthrosis!); 2013; Osteoarthritis and Cartilage, 21; 16-21
- 7 BLOM, A. B., VAN LENT, P. L., LIBREGTS, S., HOLTHUYSEN, A. E., VAN DER KRAAN, P. M., VAN ROOIJEN, N. AND VAN DEN BERG, W. B.; Crucial Role of Macrophages in Matrix Metalloproteinase-Mediated Cartilage Destruction During Experimental Osteoarthritis: Involvement of Matrix Metalloproteinase 3; 2007; Arthritis and Rheumatism, 56; 147-157
- 8 BOGDAN, I., NECHIFOR, A., BASEA, I. AND HRUBAN, E.; [from Rumanian Folk Medicine: Non-Specific Stimulus Therapy Using Transcutaneous Implantation of Hellebore (Helleborus Purpurascens, Fam. Ranunculaceae) in Agriculturally Useful Animals]; 1990; Dtsch Tierarztl Wochenschr, 97; 525-9
- 9 BRAMA, P. A., VAN DEN BOOM, R., DEGROOTT, J., KIERS, G. H. AND VAN WEEREN, P. R.; Collagenase-1 (Mmp-1) Activity in Equine Synovial Fluid: Influence of Age, Joint Pathology, Exercise and Repeated Arthrocentesis; 2004; Equine Vet J, 36; 34-40
- 10 BRISTON, L., DUDHIA, J. AND LEES, P.; Age-Related Differences in Prostaglandin E2 Synthesis by Equine Cartilage Explants and Synoviocytes; 2010; J Vet Pharmacol Ther, 33; 268-76
- 11 BUENO, A. C., SEAHORN, T. L., CORNICK-SEAHORN, J., HOROHOV, D. W. AND MOORE, R. M.; Plasma and Urine Nitric Oxide Concentrations in Horses Given Below a Low Dose of Endotoxin; 1999; Am J Vet Res, 60; 969-76
- 12 CAO, M., WESTERHAUSEN-LARSON, A., NIYIBIZI, C., KAVALKOVICH, K., GEORGESCU, H., RIZZO, C., HEBDA, P., STEFANOVIC-RACIC, M. AND EVANS, C. H.; Nitric Oxide Inhibits the Synthesis of Type-I Collagen without Altering Col2a1

-
- Mrna Abundance: Prolyl Hydroxylase as a Possible Target; 1997; Biochemical Journal, 324; 305
- 13 CARBALLO, C. B., NAKAGAWA, Y., SEKIYA, I. AND RODEO, S. A.; Basic Science of Articular Cartilage; 2017; Clinics in Sports Medicine, 36; 413-425
 - 14 CARON, J. P.; Osteoarthritis, Diagnosis and Management of Lameness in the Horse; 2011; Ross M.W; Dyson S.J., pp. 655-668
 - 15 CHEN, W. P., JIN, G. J., XIONG, Y., HU, P. F., BAO, J. P. AND WU, L. D.; Rosmarinic Acid Down-Regulates No and Pge2 Expression Via Mapk Pathway in Rat Chondrocytes; 2018; J Cell Mol Med, 22; 346-353
 - 16 CHIN, J. R., MURPHY, G. AND WERB, Z.; Stromelysin, a Connective Tissue-Degrading Metalloendopeptidase Secreted by Stimulated Rabbit Synovial Fibroblasts in Parallel with Collagenase. Biosynthesis, Isolation, Characterization, and Substrates; 1985; J Biol Chem, 260; 12367-76
 - 17 CHOMCZYNSKI, P. AND SACCHI, N.; Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction; 1987; Analytical Biochemistry, 162; 156-159
 - 18 CHU, C. R., SZCZODRY, M. AND BRUNO, S.; Animal Models for Cartilage Regeneration and Repair; 2010; Tissue Eng Part B Rev, 16; 105-15
 - 19 CIOACA, C. AND CUCU, V.; Quantitative Determination of Hellebrin in the Rhizomes and Roots of Helleborus Purpurascens W. Et K; 1974; Planta Med, 26; 250-3
 - 20 CLEGG, P. D. AND MOBASHERI, A.; Chondrocyte Apoptosis, Inflammatory Mediators and Equine Osteoarthritis; 2003; Vet J, 166; 3-4
 - 21 CLUTTERBUCK, A. L., HARRIS, P., ALLAWAY, D. AND MOBASHERI, A.; Matrix Metalloproteinases in Inflammatory Pathologies of the Horse; 2010; The Veterinary Journal, 183; 27-38
 - 22 DE BOSSCHER, K., VANDEN BERGHE, W. AND HAEGEMAN, G.; The Interplay between the Glucocorticoid Receptor and Nuclear Factor-Kappab or Activator Protein-1: Molecular Mechanisms for Gene Repression; 2003; Endocr Rev, 24; 488-522
 - 23 DE GRAUW, J. C., VAN DE LEST, C. H. AND VAN WEEREN, P. R.; Inflammatory Mediators and Cartilage Biomarkers in Synovial Fluid after a Single Inflammatory Insult: A Longitudinal Experimental Study; 2009; Arthritis Res Ther, 11; R35
 - 24 DE GRAUW, J. C., VAN DE LEST, C. H. A., BRAMA, P. A. J., RAMBAGS, B. P. B. AND VAN WEEREN, P. R.; In Vivo Effects of Meloxicam on Inflammatory Mediators, Mmp Activity and Cartilage Biomarkers in Equine Joints with Acute Synovitis; 2009; Equine Veterinary Journal, 41; 693-699

-
- 25 DESCHAMPS, A. M. AND SPINALE, F. G.; Pathways of Matrix Metalloproteinase Induction in Heart Failure: Bioactive Molecules and Transcriptional Regulation; 2006; Cardiovasc Res, 69; 666-76
 - 26 DIETEL, B., MUENCH, R., KUEHN, C., KEREK, F., STEINKASSERER, A., ACHENBACH, S., GARLICH, C. D. AND ZINSER, E.; Mcs-18, a Natural Product Isolated from Helleborus Purpurascens, Inhibits Maturation of Dendritic Cells in Apoe-Deficient Mice and Prevents Early Atherosclerosis Progression; 2014; Atherosclerosis, 235; 263-72
 - 27 DIJKGRAAF, L. C., DE BONT, L. G., BOERING, G. AND LIEM, R. S.; Normal Cartilage Structure, Biochemistry, and Metabolism: A Review of the Literature; 1995; J Oral Maxillofac Surg, 53; 924-9
 - 28 EL-WARRAK, A., OLMSTEAD, M., SCHNEIDER, R., MEINEL, L., BETTSCHART-WOLFISBERGER, R., AKENS, M., AUER, J. AND VON RECHENBERG, B.; An Experimental Animal Model of Aseptic Loosening of Hip Prostheses in Sheep to Study Early Biochemical Changes at the Interface Membrane; 2004; feedback,
 - 29 EVANS, C. H., WATKINS, S. C. AND STEFANOVIC-RACIC, M.; Nitric Oxide and Cartilage Metabolism; 1996; Methods Enzymol, 269; 75-88
 - 30 FAN, Z., SODER, S., OEHLER, S., FUNDEL, K. AND AIGNER, T.; Activation of Interleukin-1 Signaling Cascades in Normal and Osteoarthritic Articular Cartilage; 2007; Am J Pathol, 171; 938-46
 - 31 FARLEY, J., SIROIS, J., MACFARLANE, P. H., KOMBE, A. AND LAVERTY, S.; Evaluation of Coexpression of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 and Cyclooxygenase-2 in Interleukin-1-Stimulated Equine Articular Chondrocytes; 2005; Am J Vet Res, 66; 1985-91
 - 32 FEELISCH, M.; The Chemical Biology of Nitric Oxide — an Outsider's Reflections About Its Role in Osteoarthritis; 2008; Osteoarthritis and Cartilage, 16; S3-S13
 - 33 FREAN, S. P., BRYANT, C. E., FROLING, I. L., ELLIOTT, J. AND LEES, P.; Nitric Oxide Production by Equine Articular Cells in Vitro; 1997; Equine Vet J, 29; 98-102
 - 34 FREUDENMANN, F.; Neue Hemmstoffe Der Na/K-Atpase Aus Helleborus Purpurascens; 2003;
 - 35 FRISBIE, D. D.; Synovial Joint Biology and Pathobiology; 2012; 1096-1114
 - 36 FU, X., PARKS, W. C. AND HEINECKE, J. W.; Activation and Silencing of Matrix Metalloproteinases; 2008; Semin Cell Dev Biol, 19; 2-13
 - 37 FULLMER, H. M. AND GIBSON, W.; Collagenolytic Activity in Gingivae of Man; 1966; Nature, 209; 728-9

-
- 38 GENG, Y.; Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression in Normal Human Articular Chondrocytes; 1995; The Journal of Immunology, 155; 796-801
 - 39 GOLDRING, M., CULLEY, K.L., WONDIMU, E., OTERO, M.; Textbook of Rheumatology (Kelley & Firestein's); 2017;
 - 40 GOLDRING, M. AND GOLDRING, S.; Skeletal Tissue Response to Cytokines.; 1990; Clin Orthop Relat Res, 258; 245-78
 - 41 GOLDRING, M. B.; The Role of the Chondrocyte in Osteoarthritis; 2000; Arthritis Rheum, 43; 1916-26
 - 42 GOLDRING, S. R. AND GOLDRING, M. B.; The Role of Cytokines in Cartilage Matrix Degeneration in Osteoarthritis; 2004; Clin Orthop Relat Res, S27-36
 - 43 GREEN, L., WAGNER, D., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P., WISHNOK, J. AND TANNENBAUM, S.; Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15n] Nitrate in Biological Fluids; 1982; Analytical Biochemistry, 126; 131-138
 - 44 HARDY, J., BERTONE, A., WEISBRODE, S., MUIR, W., O'DORISIO, T. AND MASTY, J.; Cell Trafficking, Mediator Release, and Articular Metabolism in Acute Inflammation of Innervated or Denervated Isolated Equine Joints.; 1998; Am J Vet Res, 59; 88-100
 - 45 HEINRICH, P. C., CASTELL, J. V. AND ANDUS, T.; Interleukin-6 and the Acute Phase Response; 1990; Biochem J, 265; 621-36
 - 46 HILDEBRANDT, H.; Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch; 1997; 258.;
 - 47 HOLLAND, P. M., ABRAMSON, R. D., WATSON, R. AND GELFAND, D. H.; Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5'----3' Exonuclease Activity of Thermus Aquaticus DNA Polymerase; 1991; Proc Natl Acad Sci U S A, 88; 7276-80
 - 48 HORSTMANN, B., ZINSER, E., TURZA, N., KEREK, F. AND STEINKASSERER, A.; Mcs-18, a Novel Natural Product Isolated from Helleborus Purpurascens, Inhibits Dendritic Cell Activation and Prevents Autoimmunity as Shown in Vivo Using the Eae Model; 2007; Immunobiology, 212; 839-53
 - 49 JÄRVINEN, T., MOILANEN, T., JÄRVINEN, T. AND MOILANEN, E.; Endogenous Nitric Oxide and Prostaglandin E 2 Do Not Regulate the Synthesis of Each Other in Interleukin-1 β -Stimulated Rat Articular Cartilage; 1996; Inflammation, 20; 683-692
 - 50 JUNQUEIRA L.C., C. J.; Histologie; 1996; 4. Auflage; 181 ff.
 - 51 KAWCAK, C., FRISBIE, D., TROTTER, G., MCLWRAITH, C., GILLETTE, S., POWERS, B. AND WALTON, R.; Effects of Intravenous Administration of Sodium Hyaluronate on Carpal Joints in Exercising Horses after Arthroscopic Surgery and Osteochondral Fragmentation.; 1997; Am J Vet Res, 58; 1132-40

-
- 52 KEREK, F.; The Structure of the Digitalislike and Natriuretic Factors Identified as Macrocyclic Derivatives of the Inorganic Carbon Suboxide; 2000; *Hypertens Res*, 23 Suppl; S33-8
- 53 KEREK, F., STIMAC, R., APELL, H. J., FREUDENMANN, F. AND MORODER, L.; Characterization of the Macrocyclic Carbon Suboxide Factors as Potent Na,K-ATPase and Sr Ca-ATPase Inhibitors; 2002; *Biochim Biophys Acta*, 1567; 213-20
- 54 KEREK, F., SZEGLI, G., CREMER, L., LUPU, A., DURBACA, S., CALUGARU, A., HEROLD, A. AND RADU, D.; The Novel Arthritis-Drug Substance Mcs-18 Attenuates the Antibody Production in Vivo; 2008; *Acta Microbiol Immunol Hung*, 55; 15-31
- 55 KERR, R., STIRLING, D. AND LUDLAM, C. A.; Interleukin 6 and Haemostasis; 2001; *Br J Haematol*, 115; 3-12
- 56 KOOLMAN J, R. K.; *Taschenatlas Der Biochemie*; 1998; 368
- 57 KUEHN, C., TAUCHI, M., STUMPF, C., DANIEL, C., BAUERLE, T., SCHWARZ, M., KEREK, F., STEINKASSERER, A., ZINSER, E., ACHENBACH, S. AND DIETEL, B.; Suppression of Proatherogenic Leukocyte Interactions by Mcs-18--Impact on Advanced Atherosclerosis in Apoe-Deficient Mice; 2016; *Atherosclerosis*, 245; 101-10
- 58 LEONG, D. J., GU, X. I., LI, Y., LEE, J. Y., LAUDIER, D. M., MAJESKA, R. J., SCHAFFLER, M. B., CARDOSO, L. AND SUN, H. B.; Matrix Metalloproteinase-3 in Articular Cartilage Is Upregulated by Joint Immobilization and Suppressed by Passive Joint Motion; 2010; *Matrix Biol*, 29; 420-6
- 59 LEUTENEGGER, C.; Quantitative Real-Time Pcr for Equine Cytokine Mrna in Nondecalfified Bone Tissue Embedded in Methyl Methacrylate; 1999; *Calcified Tissue International*, 65; 378-383
- 60 LITTMANN, L., ROSSNER, S., KEREK, F., STEINKASSERER, A. AND ZINSER, E.; Modulation of Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells and B-Cells by Mcs-18 a Natural Product Isolated from *Helleborus Purpurascens*; 2008; *Immunobiology*, 213; 871-8
- 61 LOPPNOW, H.; [Cytokines: Classification, Receptors, Mechanisms of Action]; 2001; *Internist (Berl)*, 42; 13-4, 17-27
- 62 LORENZO, J. A.; The Role of Cytokines in the Regulation of Local Bone Resorption; 1991; *Crit Rev Immunol*, 11; 195-213
- 63 LUPU, A. R., CREMER, L., KEREK, F., CALUGARU, A., BADULESCU, M. M., FLONTA, M. L. AND SZEGLI, G.; New Natural Compound Mcs-18, a Tlr-2 Antagonist Able to Down-Regulate Inflammation-Related Pain; 2009; *European Journal of Pain*, 13; 527

-
- 64 MACDONALD, M. H., STOVER, S. M., WILLITS, N. H. AND BENTON, H. P.; Effect of Bacterial Lipopolysaccharides on Sulfated Glycosaminoglycan Metabolism and Prostaglandin E2 Synthesis in Equine Cartilage Explant Cultures; 1994; Am J Vet Res, 55; 1127-38
- 65 MACKAY, R. J. AND LESTER, G. D.; Induction of the Acute-Phase Cytokine, Hepatocyte-Stimulating Factor/Interleukin 6, in the Circulation of Horses Treated with Endotoxin; 1992; Am J Vet Res, 53; 1285-9
- 66 MALIK, J., TAUCHEN, J., LANDA, P., KUTIL, Z., MARSIK, P., KLOUCEK, P., HAVLIK, J. AND KOKOSKA, L.; In Vitro Antiinflammatory and Antioxidant Potential of Root Extracts from Ranunculaceae Species; 2017; South African Journal of Botany, 109; 128-137
- 67 MARTEL-PELLETIER, J., WELSCH, D. J. AND PELLETIER, J. P.; Metalloproteases and Inhibitors in Arthritic Diseases; 2001; Best Pract Res Clin Rheumatol, 15;
- 68 MARTINEK, V.; Anatomie Und Pathophysiologie Des Hyalinen Knorpels; 2003;
- 69 MAUCK, R. L., WANG, C. C., OSWALD, E. S., ATESHIAN, G. A. AND HUNG, C. T.; The Role of Cell Seeding Density and Nutrient Supply for Articular Cartilage Tissue Engineering with Deformational Loading; 2003; Osteoarthritis Cartilage, 11; 879-90
- 70 MAY, S. A., HOOKE, R. E. AND LEES, P.; Equine Chondrocyte Activation by a Variety of Stimuli; 1992; Br Vet J, 148; 389-97
- 71 MCCACHREN, S. S.; Expression of Metalloproteinases and Metalloproteinase Inhibitor in Human Arthritic Synovium; 1991; Arthritis Rheum, 34; 1085-93
- 72 MCILWRAITH, C.; Pathology of the Joint and Response to Injury. In: Mcilwraith Cw, Trotter, Eds. Joint Diseases in the Horse.; 1996; 40-69
- 73 MCILWRAITH, C. W.; Joint Disease in the Horse; 2001; Equine Immunology, 94-96
- 74 MCILWRAITH, C. W. AND GOODMAN, N. L.; Conditions of the Interphalangeal Joints; 1989; Vet Clin North Am Equine Pract, 5; 161-78
- 75 MCILWRAITH, C. W. F., D.D.; KAWCAK C.E.; VAN WEEREN R.; Joint Disease in the Horse; 2015;
- 76 MORRIS, D. D., CROWE, N., MOORE, J. N. AND MOLDAWER, L. L.; Endotoxin-Induced Production of Interleukin 6 by Equine Peritoneal Macrophages in Vitro; 1992; Am J Vet Res, 53; 1298-301
- 77 MORRIS, D. D., MOORE, J. N., CROWE, N. AND MOLDAWER, L. L.; Effect of Experimentally Induced Endotoxemia on Serum Interleukin-6 Activity in Horses; 1992; Am J Vet Res, 53; 753-6

-
- 78 MUHR, P., KEREK, F., DREVENY, D., LIKUSSAR, W. AND SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; The Structure of Hellebrin; 1995; *Cheminform*, 26;
- 79 MURRELL, G. A., DOLAND, M. M., JANG, D., SZABO, C., WARREN, R. F. AND HANNAFIN, J. A.; Nitric Oxide: An Important Articular Free Radical; 1996; *J Bone Joint Surg Am*, 78; 265-74
- 80 MURRELL, G. A. C., JANG, D. AND WILLIAMS, R. J.; Nitric Oxide Activates Metalloprotease Enzymes in Articular Cartilage; 1995; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 206; 15-21
- 81 NEACSU, C., CIOBANU, C., BARBU, I., TOADER, O., SZEGLI, G., KEREK, F. AND BABES, A.; Substance Mcs-18 Isolated from *Helleborus Purpurascens* Is a Potent Antagonist of the Capsaicin Receptor, Trpv1, in Rat Cultured Sensory Neurons; 2010; *Physiol Res*, 59; 289-98
- 82 NIETHARD, F. U., PFEIL, J.; BIBERTHALER, P.; *Anatomie Und Physiologie Des Gelenks*; 2014;
- 83 NOTOYA, K., JOVANOVIC, D. V., REBOUL, P., MARTEL-PELLETIER, J., MINEAU, F. AND PELLETIER, J. P.; The Induction of Cell Death in Human Osteoarthritis Chondrocytes by Nitric Oxide Is Related to the Production of Prostaglandin E2 Via the Induction of Cyclooxygenase-2; 2000; *J Immunol*, 165; 3402-10
- 84 OH, M., FUKUDA, K., ASADA, S., YASUDA, Y. AND TANAKA, S.; Concurrent Generation of Nitric Oxide and Superoxide Inhibits Proteoglycan Synthesis in Bovine Articular Chondrocytes: Involvement of Peroxynitrite; 1998; *The Journal of rheumatology*, 25; 2169-2174
- 85 PALMER, J. L., BERTONE, A. L., MALEMUD, C. J. AND MANSOUR, J.; Biochemical and Biomechanical Alterations in Equine Articular Cartilage Following an Experimentally-Induced Synovitis; 1996; *Osteoarthritis Cartilage*, 4; 127-37
- 86 PETROV, R., MACDONALD, M. H., TESCH, A. M. AND BENTON, H. P.; Inhibition of Adenosine Kinase Attenuates Interleukin-1- and Lipopolysaccharide-Induced Alterations in Articular Cartilage Metabolism; 2005; *Osteoarthritis Cartilage*, 13; 250-7
- 87 QIAGEN; *Rneasy Mini Handbook*; 06/2001;
- 88 RA, H. J. AND PARKS, W. C.; Control of Matrix Metalloproteinase Catalytic Activity; 2007; *Matrix Biol*, 26; 587-96
- 89 RAETZ, C. R. AND WHITFIELD, C.; Lipopolysaccharide Endotoxins; 2002; *Annu Rev Biochem*, 71; 635-700
- 90 ROBINSON, J. A., ALLEN, G. K., GREEN, E. M., GARNER, H. E., LOCH, W. E. AND WALSH, D. M.; Serum Interleukin-6 Concentrations in Endotoxin-Infused Neonatal Foals; 1993; *Am J Vet Res*, 54; 1411-4

-
- 91 SCHER, J., PILLINGER, M. AND ABRAMSON, S.; Nitric Oxide Synthases and Osteoarthritis; 2007; Current Rheumatology Reports, 9; 9-15
 - 92 SCHWARTZ, D., CHOI, Y., SANDELL, L. AND HANSON, W.; Quantitative Analysis of Collagen, Protein and DNA in Fixed, Paraffin-Embedded and Sectioned Tissue; 1985; The Histochemical Journal, 17; 655-663
 - 93 SEIFARTH, C., LITTMANN, L., RESHEQ, Y., ROSSNER, S., GOLDWICH, A., PANGRATZ, N., KEREK, F., STEINKASSERER, A. AND ZINSER, E.; Mcs-18, a Novel Natural Plant Product Prevents Autoimmune Diabetes; 2011; Immunol Lett, 139; 58-67
 - 94 SEIFARTH, C., LITTMANN, L., RESHEQ, Y., RÖSSNER, S., GOLDWICH, A., PANGRATZ, N., KEREK, F., STEINKASSERER, A. AND ZINSER, E.; Mcs-18, a Novel Natural Plant Product Prevents Autoimmune Diabetes; 2011; Immunology Letters, 139; 58-67
 - 95 SINKOV, V. AND CYMET, T.; Osteoarthritis: Understanding the Pathophysiology, Genetics, and Treatments.; 2003; J Natl Med Assoc, 95; 475-82
 - 96 SMITH, G. N., JR., HASTY, K. A., YU, L. P., JR., LAMBERSON, K. S., MICKLER, E. A. AND BRANDT, K. D.; Cleavage of Type Xi Collagen Fibers by Gelatinase and by Extracts of Osteoarthritic Canine Cartilage; 1991; Matrix, 11; 36-42
 - 97 STADLER, J.; Articular Chondrocytes Synthesize Nitric Oxide in Response to Cytokines and Lipopolysaccharide; 1991; The Journal of Immunology, 147; 3915-3920
 - 98 STASHAK, T. S.; Adam's Lameness in Horses; 2002; 357 ff.
 - 99 STEFANOVIC-RACIC, M., STADLER, J. AND EVANS, C. H.; Nitric Oxide and Arthritis; 1993; Arthritis Rheum, 36; 1036-44
 - 100 STEFANOVIC-RACIC, M., STADLER, J., GEORGESCU, H. I. AND EVANS, C. H.; Nitric Oxide and Energy Production in Articular Chondrocytes; 1994; J Cell Physiol, 159; 274-80
 - 101 STEGEMANN, H. AND STALDER, K.; Determination of Hydroxyproline.; 1967; Clin Chim Acta, 18; 267-73
 - 102 STIMAC, R.; Macrocyclic Carbon Suboxide Derivatives : Novel Potent Inhibitors of the Na,K-Atpase, and Their Mechanism of Inhibition; 2004; Dissertation,
 - 103 STIMAC, R., KEREK, F. AND APELL, H. J.; Mechanism of the Na,K-Atpase Inhibition by Mcs Derivatives; 2005; J Membr Biol, 205; 89-101
 - 104 SUTTON, S., CLUTTERBUCK, A., HARRIS, P., GENT, T., FREEMAN, S., FOSTER, N., BARRETT-JOLLEY, R. AND MOBASHERI, A.; The Contribution of the Synovium, Synovial Derived Inflammatory Cytokines and Neuropeptides to the Pathogenesis of Osteoarthritis; 2009; Vet J, 179; 10-24

-
- 105 SWIDERSKI, C. E., SOBOL, G., LUNN, D. P. AND HOROHOV, D. W.; Molecular Cloning, Sequencing, and Expression of Equine Interleukin-6; 2000; Vet Immunol Immunopathol, 77; 213-20
 - 106 TODHUNTER, P. G., KINCAID, S. A., TODHUNTER, R. J., KAMMERMAN, J. R., JOHNSTONE, B., BAIRD, A. N., HANSON, R. R., WRIGHT, J. M., LIN, H. C. AND PUROHIT, R. C.; Immunohistochemical Analysis of an Equine Model of Synovitis-Induced Arthritis; 1996; Am J Vet Res, 57; 1080-93
 - 107 TORZILLI, P. A., ADAMS, T. C. AND MIS, R. J.; Transient Solute Diffusion in Articular Cartilage; 1987; J Biomech, 20; 203-14
 - 108 TUNG, J. T., ARNOLD, C. E., ALEXANDER, L. H., YUZBASIYAN-GURKAN, V., VENTA, P. J., RICHARDSON, D. W. AND CARON, J. P.; Evaluation of the Influence of Prostaglandin E2 on Recombinant Equine Interleukin-1beta-Stimulated Matrix Metalloproteinases 1, 3, and 13 and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1 Expression in Equine Chondrocyte Cultures; 2002; Am J Vet Res, 63; 987-93
 - 109 UNIPROT, C.; The Universal Protein Knowledgebase; 2017;
 - 110 VAN DEN BERG, W.; The Role of Cytokines and Growth Factors in Cartilage Destruction in Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis; 1999; Zeitschrift für Rheumatologie, 58; 136-141
 - 111 VAN WEEREN, P. R. AND BACK, W.; Musculoskeletal Disease in Aged Horses and Its Management; 2016; Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 32; 229-247
 - 112 VAN WEEREN, P. R. AND DE GRAUW, J. C.; Pain in Osteoarthritis; 2010; Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 26; 619-642
 - 113 VISSE, R. AND NAGASE, H.; Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry; 2003; Circ Res, 92;
 - 114 VON RECHENBERG, B.; Subchondral Cystic Lesions in Horses; 1999;
 - 115 VON RECHENBERG, B., LEUTENEGGER, C., ZLINSKY, K., MCLWRAITH, C., AKENS, M. AND AUER, J.; Upregulation of Mrna of Interleukin-1 and-6 in Subchondral Cystic Lesions of Four Horses; 2001; Equine Veterinary Journal, 33; 143-149
 - 116 VON RECHENBERG, B., LEUTENEGGER, C., ZLINSKY, K., MCLWRAITH, C. W., AKENS, M. K. AND AUER, J. A.; Upregulation of Mrna of Interleukin-1 and -6 in Subchondral Cystic Lesions of Four Horses; 2001; Equine Vet J, 33; 143-9
 - 117 VON RECHENBERG, B., MCLWRAITH CW, AKENS MK, FRISBIE DD, LEUTENEGGER C, AUER JA; Spontaneous Production of Nitric Oxide (No), Prostaglandine (Pge2) and Neutral Metalloproteinases (Nmpps) in Media of Explant Cultures of Equine Synovial Membrane and Articular Cartilage from Normal and Osteoarthritic Joints; 2000; Equine Vet J, 32; 140-150

-
- 118 WATROUS, D. AND ANDREWS, B.; The Metabolism and Immunology of Bone.; 1989; Semin Arthritis Rheum, 19; 45-65
- 119 WERB, Z. AND REYNOLDS, J. J.; Stimulation by Endocytosis of the Secretion of Collagenase and Neutral Proteinase from Rabbit Synovial Fibroblasts; 1974; J Exp Med, 140; 1482-97
- 120 WUELLING, M. AND VORTKAMP, A.; Cartilage Explant Cultures; 2014; Methods Mol Biol, 1130; 89-97

9. Danksagung

Ich danke all jenen von ganzem Herzen, welche zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere

- Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg für das Überlassen des Themas, das Design des Projektes, sowie die Hilfsbereitschaft und die unendliche Geduld.
- Prof. Dr. Karin Würtz-Kozak, ETH Zürich, Institut für Biomechanik, für die Übernahme des Ko-Referats und die sehr speditive Durchsicht.
- Dr. Franz Kerek, DoNatur, D-Martinsried, für die Bereitstellung von MCS-18.
- Adrian Fairburn für sein unschätzbares Guiding im Labor, sowie für seinen unübertrefflichen Humor.
- Bruno Gerzner, Metzgerei Tierspital Zürich, für die zuvorkommende Hilfe bei der Beschaffung des Probenmaterials, sowie der Metzgerei E. Müller, in Niederglatt, für die Bereitstellung der Pferdebeine.
- Kathrin Süess und Prof. Geyer, Anatomisches Institut, Vetsuisse Fakultät Zürich, für die Überlassung der Räumlichkeiten, sowie der Hilfseinrichtungen.
- Rainer Egle, für die Unterstützung in allen Computerfragen.
- Jens Langhoff vom Strickhof-Team für seine geduldige Hilfe bei allen Fragen drumherum.
- der MSRU-Crew: Alexander El-Warrak, Anja Waselau-Hering, Bastian Brand, Bernie Schöpf, Cécile von Dörnberg, Detlef Apelt, Felix Theiss, Flurina Clement, Jan Kümmerle, Jessica Müller, Katja Schulze, Margarete Akens, Martin Waselau, Matthias Kemper, Rébecca Schneider Häfliger, Regula Keel, Ruth Fiechter, sowie Kati Zlinszky von der Pathologie.
- Gisella Brachs-Lenatti für die liebevolle Gastfreundschaft in ihrem Atelier, sowie all die kulinarischen Freuden.
- Doris Süess für die regelmässigen Motivationsspritzen und den Kurierdienst.
- Meinen „besten Nachbarn der Welt“ Bethli + Paul Nater.
- Meiner Familie: Urban, Mumma, Tim, Livio, Gion und Tatta, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

10. Curriculum vitae

Personalien

Name	Dorina Truniger-Hambsch
Geburtsdatum	26.02.1970
Geburtsort	Brugg AG
Heimatort	Kirchberg SG und Turgi AG
Zivilstand	verheiratet mit Urban Truniger, 3 Söhne (Tim Andrin 2007, Livio Severin 2009, Gion Mattia 2015)

Ausbildung

1976-1982	Primarschule Flims GR
1982-1985	Sekundarschule Institut St. Josef, Ilanz GR
1985-1988	Kaufmännische Lehre, Advokaturbüro Homburger, Zürich
1993-1996	TSME (TG-SH-Maturitätsschule für Erwachsene), Frauenfeld
1996-2002	Studium der Veterinärmedizin, Zürich

2002-2019

Anfertigung der Dissertation

"Entzündungshemmende Wirkung von makrozyklischem Carbonsuboxid (MCS-18) aus Helleborus purpurascens auf equine Knorpelzellen (in vitro-Studie)"

unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. B. von Rechenberg,
an der Musculoskeletal Research Unit (MSRU),
am Departement für Pferde,
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich,
Vorsteher: Prof. Dr. med. vet. Colin C. Schwarzwald

Berufliche Tätigkeit

1989-1990	Homburger & Partner, Zürich, Sekretariat
1990-1993	Jacobs Suchard AG, Zürich, Controlling
1993	Solis AG, Glattbrugg, Einkauf/Export
1994-2004	McKinsey & Co., Zürich, Visual Aids Specialist
2003-2004	MSRU/Pferdeklinik, Satteldruckmessgruppe
2004-2006	Dres. med. vet. Schär & Wick, Affeltrangen, Gemischtpraxis
2006-heute	tezet AG, Tiermedizinisches Zentrum, Müllheim, Tierärztin für Kleintiere